50376 1983 275



50376 1983 **27**5

N° d'ordre 602

présentée à

# L'Universite des Sciences et Techniques de Lille

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES

par

### **Christiane Devaux**

### ANALYSE STRUCTURALE

**DE L'ADENOVIRUS** 

HUMAIN



le 28 octobre 1983 devant le Jury composé de :

MM. MONTREUIL : Président BOULANGER HIRTH JACROT LOUCHEUX Ce travail a été réalisé :

### A Lille

Au Laboratoire de Virologie Moléculaire , INSERM U 233.

### A Grenoble

A l'Institut Max Von Laüe et Paul Langevin. Au Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire. Messieurs Montreuil, Hirth, Loucheux,

vous m'avez fait l'honneur de juger cette thèse et je vous en remercie.

#### Monsieur Pierre Boulanger,

vous m'avez accueillie dans le Nord et vous m'avez initiée à la virologie , puis vous m'avez encouragée à m'intéresser aux techniques physiques . Pour tout cela , aussi bien que pour vos conseils permanents et la grande liberté que vous m'avez laissée pour la conduite de ce travail, soyez profondément remercié.

#### Monsieur Bernard Jacrot,

avec patience vous avez guidé la biochimiste que je suis parmi les physiciens ; votre enthousiasme et vos encouragements m'ont constamment soutenue tout au long de ces années de recherches.Merci. Ce travail est le résultat d'un effort d'équipe . Il n'aurait pas été possible sans le concours de

Carmen Berthet-Colominas

et

Peter Timmins

merci à tous deux pour votre collaboration efficace et sympathique.

Aux équipes des laboratoires de Lille et Grenoble ,

merci infiniment pour votre aide amicale.

L'objectif de ce travail est de contribuer à l'analyse de la structure de l'adénovirus humain en utilisant essentiellement les techniques de diffusion de neutrons et de rayons X, en association avec la microscopie électronique et les méthodes biochimiques classiques.

En première partie, nous résumerons les connaissances actuelles sur le matériel étudié, l'adénovirus, et nous tenterons d'exposer les principes théoriques et les domaines d'application des techniques utilisées.

La seconde partie sera consacrée à la présentation de nos résultats: détermination du poids moléculaire de deux protéines (la fibre et la base du penton), puis élaboration d'un modèle structural du virus. Les travaux exposés dans ce mémoire font référence implicite à d'autres travaux personnels plus anciens portant sur la structure des composants de l'adénovirus et qui n'ont pas été inclus ici:

- Isolation and characterization of a slow-migrating class of adenovirus type 2 hexons.
   Boulanger, P., Devaux, C. et Lemay, P.
   Virology (1978) <u>84</u>, 456-468.
- 2. Comparative optical properties of free and assembled hexons capsomeres of adenovirus type 2. Boulanger, P., Devaux, C. et Loucheux, M.H. FEBS letters (1978) 85, 52-56.
- 3. Reactive serine in human adenovirus polypeptide. Devaux, C. et Boulanger P. Virology (1980) 102, 94-106.

Les travaux exposés ont fait l'objet des publications suivantes:

4. Molecular weight of adenovirus type 2 capsomers. A new characterization. Devaux, C., Zulauf, M., Boulanger, P. et Jacrot, B. J. Mol. Biol. (1982) 156, 927-939.

- 5. Native molecular weight of adenovirus proteins: on the oligomeric structure of the fiber. Boulanger, P. et Devaux C. Biochem. Biophys. Res. Commun. (1983) <u>110</u>, 913-918.
- 6. Structural studies of adenovirus type 2 by neutron and X-ray scattering. Devaux, C., Timmins, P.A. et Berthet-Colominas, C. J. Mol. Biol. (1983) <u>166</u>, 119-132.
- 7. Crystal Packing and stoichiometry of the fibre protein of adenovirus type 2. Devaux, C., Berthet-Colominas, C., Timmins, P., Boulanger, P. et Jacrot, B. J. Mol. Biol. soumis à publication.

## Abréviations

Virus ~~~~~ TBSV Virus du rabougrissement buissonneux de la tomate. TYMV Virus de la mosaïque jaune du navet. Virus de la mosaïque du haricot du sud. SBMV Satellite du virus de la nécrose du tabac. STNV SV40 Virus de singe Cellules \_ \_ \_ \_ \_ \_ Cellule de rein de singe vert d'Afrique. AGMK Cellules poussant en lignée continue et provenant de HeLa KB cancers humains.

### Réactifs

\_\_\_\_\_

DOC	désoxycholate de sodium
SDS	dodécyl sulfate de sodium
PEG	polyéthylèneglycol

D.O. densité optique

P.M. poids moléculaire

rpm rotation par minute.

### PLAN

pa	age
INTRODUCTION	
GENERALITES I. LE MATERIEL BIOLOGIQUE	1
LES VIRUS	2
LES ADENOVIRUS	3
I. ORGANISATION DE LA CAPSIDE	4
1. Architecture de la capside des virus.	4
2. Les protéines de la capside	6
a. les hexons et les protéines associées	7
b. la protéine IIIa	9
c. le penton	9
II. STRUCTURE DU DNA VIRAL	11
III. ORGANISATION DU NUCLEOIDE	11
IV. INFECTION DE LA CELLULE PAR UN ADENOVIRUS	13
1. Fixation et pénétration du virus	13
2. Phase précoce	14
3. Réplication et phase tardive	14
4. Morphogénèse	15
a. les particules incomplètes	15
b. les jeunes virions	16
GENERALITES II :LES TECHNIQUES D'ANALYSE DE LA STRUCTUR	Ξ
LA STRUCTURE	19
LES TECHNIQUES UTILISEES	21
I. DIFFUSION ET DIFFRACTION (PRINCIPE)	22
II. DIFFUSION DE NEUTRONS ET DE RAYONS X PAR DES	
VIRUS EN SOLUTION	23
1.Variation de contraste	24
2.Analyse des données de la diffusion de neutrons	26
a. approximation de Guinier : Io , Rg	26
b. détermination d'un rayon , utilisation	
des autres maxima de la courbe	28
c. transformée de Fourier inverse et	
ajustement d'un modèle	28
3. Diffusion de rayons X	30

III. DIFFUSION DE NEUTRONS ET DE RAYONS X PAR DES	
PARTICULES ALLONGEES	30
IV. DIFFRACTION	31
1. Notion de cristal	31
2. Diffraction de rayons X : conditions	
expérimentales	33
a. méthode du cristal tournant : monocristal	33
b. méthode des poudres	33
3. Diffraction en microscopie électronique	33
TRAVAUX PERSONNELS I. LES PROTEINES	
INTRODUCTION	38
I. DIFFUSION DE NEUTRONS	39
1. Mesure de concentration	39
2. Mesure de diffusion de neutrons	40
II. DETERMINATION DES PARAMETRES HYDRODYNAMIQUES	40
III. INTERPRETATION QUANTITATIVE DES ELECTROPHESES	
EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS	42
IV. ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PROTEINES	
NATIVES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE	
POLYACRYLAMIDE EN MILIEU NON-DISSOCIANT	44
V. ARRANGEMENT DES MOLECULES DE FIBRES DANS LE	
CRISTAL ET STOECHIOMETRIE	46
1. Cristallisation	
2. Caractérisation du cristal de fibre :	46
dimensions de la maille et groupe d'espace	47
a. microscopie électronique	47
b. rayons X	48
3. Modèle d'assemblage des fibres dans le cristal	48
4. Densité du cristal et stoechiométrie de la	
fibre	49
a. gradients de Ficoll	49
b. mélanges organiques	49
c. gradients de Percoll	50
d. résultats	50
e. stoechiométrie	51
VI. CONCLUSION	52

ANNEXE : ARTICLES 1 , 2 , 3

### TRAVAUX PERSONNELS II. LE VIRUS

I. INTRODUCTION	56				
II. DIFFUSION DE NEUTRONS A PETITS ANGLES :					
DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE					
1. Les échantillons	56				
2. Méthode de mesure	57				
a. mesure de l'absorbance	58				
b. mesure du coefficient d'extinction	58				
3. Détermination du poids moléculaire	58				
III. DIFFUSION DE NEUTRONS : VARIATION DE CONTRASTE	61				
1. Modèles sphérique et icosaédrique à 3 couches					
(virus mature)	61				
2. Interprétation du modèle	61				
3. Résultats préliminaires pour le mutant H <sub>2</sub> ts112					
IV. DIFFUSION DE RAYONS X	64				
1. Les échantillons	64				
2. Diagrammes de diffusion	65				
a. le virus	65				
b. les nucléoïdes	66				
c. les échantillons colorés par Hg <sup>++</sup>	66				
d. le mutant H <sub>2</sub> ts112	67				
e. les groupes de 9 hexons	68				
V. CONCLUSION	70				

### ANNEXE : ARTICLE 4

CONCLUSION	GENERALE	ET	PERSPECTIVES	73
REFERENCES				76

## LES VIRUS

Les virus sont des particules complexes, de tailles diverses, constitués d'une seule sorte d'acide nucléique (DNA ou RNA) protégé par une coque protéique ou capside. Ils peuvent être enveloppés ou non, contiennent une ou plusieurs protéines et parfois des sucres et des lipides.Leurs capsides sont toujours formées d'un grand nombre de molécules protéiques identiques organisées en une structure symétrique hélicoïdale ou cubique (quasi-sphérique)

Les virus ne peuvent se reproduire qu'en infectant une cellule vivante (végétale, animale ou bactérie). Ce sont des parasites obligatoires qui détournent le mécanisme enzymatique de la cellule hôte à leur profit. Si l'on excepte viroïdes (petites molécules d'acide les nucléique, infectieuses, sans capsides protéiques, mises en évidence dans les plantes) les virus peuvent être considérés comme les plus simples formes de vie. L'acide nucléique viral porte l'information génétique nécessaire à sa propre réplication et Cette simplicité est la synthèse de ses protéines. à relative car la structure et la morphogénèse des virus font appel à des processus très élaborés, bien que nettement complexes que ceux régissant la cellule eucaryote. moins pourquoi les virus sont devenus un outil très C'est utilisé par les biologistes moléculaires: aussi bien pour comprendre mécanismes de l'infection virale elle-même ,que comme les modèles pour l'étude des gènes et des structures moléculaires à l'intérieur de la cellule vivante.

Group	Types	DNA homology	DNA (% G + C)'	Tumors in newborn hamsters	Cell transfor- mation	Transforming region homology'	T-antigen group'	HA group	Fathogenicity and epidemiology
A	12, 18, 31	48-69% within group; 8-20% with other types	Low, 47-49	High: tumors in most animals in 4 months	+	35–71% within group; 2–7% with other types	A	3B	Associated with upper respiratory infections and diarrhea; isolated from stools of children.
В	3,7,11,14,16, 21	89–94% within group; 9–20% with other types	Inter- mediate, 49–52	Weak: tumors in a few animals in 4-18 months	+	85–99% within group; 2–12% with other types	В	1A,B	Common (3, 7); moderate to severe infections; ARD epidemics among military recruits (7, also 3, 14, 21; "bad colds" and severe illness (7); summer pharyngoconjunctival fever (PCF) (3, 7); pharyngitis (3, 7); febrile pneumonia (3, 7); acute hemorrhagic cystitis (11, occasionally 21); diarrhea (16, 21).
С	1,2,5,6	99–100% within group; 10–16% with other types	High, 57–59	Nii	+	98–100% within group; 1~15% with other types	С	3A	Most common (esp. 2, 1); mild to severe infections of upper respiratory tract (especially nasopharynx) of infants and children; latent infections of lymphoid tissue; readily isolated from throat and anal swabs of children.
D	8,9,10,13,15, 17,19,20,22, 23,24,25,26, 27,28,29,30	94–99% within group; 4–17% with other types	High, 57–59	Nil, Ad9 induces mammary fi- broadenomas in rats	+	<b>N</b> , D.	D	2A-F	Ad8 and Ad19 commonly cause epidemic keratoconjunctivitis (EKC); isolated from stool.
E	4	4–23% with other types	High	Nil	ş	N.D.	Slight reac- tion with Ad3 7,2- tumor sera	3 <b>A</b>	ARD epidemics in military recruits; cause of EKC, severe PCF and pneumonia.
Undeter-	32,33,34,35								

mined

## TABLEAU 1

### Classification des adénovirus humains d'après Green et al.

BUS

1979•

.

## LES ADENOVIRUS

Les adénovirus sont des virus animaux regroupant plus de 90 sérotypes répartis dans différentes espèces (humaine, bovine, simienne, ovine, canine, porcine, équine). Mis en évidence par Rowe et al.en 1953 dans des cultures de tissus adénoides prélevés chez de jeunes enfants, ils furent isolés par la suite dans les amygdales et les sécrétions nasopharyngées de sujets malades, mais également dans les féces de sujets apparemment sains (Enders et al., 1956; Pereira et al., 1963).

La classification des 31 sérotypes humains (voir tableau I) est basée en particulier sur:

- l'homologie des séquences des désoxyribonucléotides dans le DNA viral (Green et al., 1979);
- le pouvoir oncogène, c'est à dire la potentialité d'induire des tumeurs chez les hamsters nouveau-nés. Ce pouvoir n'existe que dans les sous-groupes A et B (Huebner et al., 1965; Trentin et al., 1962);
- la parenté antigénique des protéines induites par le virus dans les cellules transformées. Tous les sérotypes humains sont capables de transformer des cellules de rongeurs in vitro (Mac Allister et al., 1969);
- l'agglutination des érythrocytes in vitro (Rosen, 1960).

Plusieurs sous-groupes distincts existent du point de vue biologique, mais tous les adénovirus présentent de grandes similitudes de structure et d'organisation: ils ne sont pas enveloppés et leur capside ,de symétrie icosaédrique (figure 1), protège un DNA double brin. Ils se reproduisent facilement dans des cellules poussant en lignée continue (KB ou HeLa), spécialement les sérotypes 2 et 5 du sous-groupe C.

La dégradation douce du virion permet d'obtenir des sous-structures stables qui ont aidé à l'analyse topologique des composants viraux.De plus, un certain nombre de mutants thermosensibles et de délétion ont été isolés et caractérisés: ils contribuent à l'étude de la morphogénèse virale.



Figure 1

a. Adénovirus de type 2 observé en microscopie électronique. (X 216000 )

88**5** 1111

b. Schéma d'un adénovirus et des constituants majeurs de la capside (d'après Philipson et Pettersson, 1973).

Depuis leur découverte les adénovirus ont donc été largement étudiés, tant pour leur structure que pour les intéressants problèmes que pose leur reproduction.

De nombreuses revues générales existent. Les plus récentes sont:

- Structure des protéines: Ginsberg, 1979.
- Organisation et expression des gènes: Flint, 1980; Herissé, 1982.
- Transcription: Lemay, 1978; Philipson, 1979.
- Génétique: D'Halluin, 1980.
- Transformation: Perricaudet et al., 1981.
- Relation cellule hôte-virus: Boulanger et Lonberg-Holm, 1981; Boulanger et Philipson, 1981.

### I. ORGANISATION DE LA CAPSIDE

## 1. Architecture de la capside des virus; cas de l'adénovirus.

La capside des virus a pour fonction de protéger l'acide nucléique. Elle doit donc se présenter comme un système clos impénétrable, en particulier par les enzymes de dégradation. En 1956, Crick et Watson font l'hypothèse que la capside virale est constituée d'unités identiques qui s'autoen une structure obligatoirement symétrique assemblent possédant des liaisons équivalentes. La construction d'un à partir d'un grand nombre d'unités identiques limite virus le nombre de structures fermées utilisables et par conséquent nombre de gènes. La structure la mieux adaptée pour le la construction des virus d'apparence sphérique est l'icosaèdre. C'est le plus grand polyèdre régulier qui existe. Il 20 а faces triangulaires et 12 sommets, et possède trois types d'axe de symétrie: ordre 5 aux sommets, 3 et 2 sur les faces et les arêtes. Il est possible de mettre 5 sous-unités protéiques autour de chacun des douze sommets, soit au total 60 sous-unités qui sont toutes dans le même environnement. Or







Nombre de triangulation

- BUS
- 1. Icosaèdre de base T = 1 présentant ses 3 types d'axe de symétrie (5, 3 et 2).
- 2. Deux exemples de subdivision d'une face par triangulations successives:

a. T = 1, 4, 9, 16 et 25
b. T = 3, 12 et 27.

(d'après Martin,1978)

la plupart des virus ont plus de 60 sous-unités. Pour les expliquer, Caspar et Klug en 1962 proposent la théorie de la "quasi-équivalence". Dans certains arrangements, les sousunités peuvent avoir presque le même environnement local et former des liaisons quasi-équivalentes avec leurs voisines. Pour augmenter le nombre de sous-unités à la d'une surface capside conservant la symétrie icosaédrique, chacune des 20 faces peut se subdiviser de façon à créer localement des pseudo-sommets d'ordre 6. Les nouvelles faces ont toutes la même surface, mais pas tout à fait le même environnement. La figure 2 montre comment peut se faire cette subdivision par triangulations successives. Chaque virus est défini par un nombre de triangulation (T).

La structure icosaédrique a été vérifiée soit par microscopie électronique, soit par cristallographie pour de nombreux virus: virus de plantes (TYMV, TBSV, etc.), virus animaux comme le poliovirus (Finch et Klug, 1959) et l'adénovirus (Horne et al., 1959).

TBSV sont des T = 3 qui possèdent 180 TYMV et sousunités identiques. Dans TYMV (Klug et al., 1966), les sousunités sont regroupées en pentamères (12 x 5, aux sommets d'ordre 5) et en hexamères (20 x 6), alors qu'elles sont regroupées en dimères (90 dimères) dans le TBSV. L'étude cristallographique à haute résolution de TBSV (Harrison et al., 1978) a montré que trois conformations différentes existent pour les sous-unités, permettant leur arrangement dans la capside de manière à réaliser des liaisons quasi équivalentes.

Un cas plus surprenant est celui du polyome (T = 7) dont la structure cristallographique (Rayment et al., 1982) а montré que tous les capsomères sont des pentamères. Dans ce les contacts entre les sous-unités ne peuvent pas être cas. tous quasi-équivalents. A la suite de ce résultat, Klug (1983) considère les difficultés qui doivent apparaître dans construction de capsides possédant des nombres la de triangulation élevés, à partir d'unités identiques. 11 suggère que la quasi-équivalence s'applique aux petits virus petits), mais que les plus grandes capsides doivent (T présenter un autre mode de construction, à l'aide d'unités spécialisées aux différentes parties de l'icosaèdre.





Modèle topologique de l'adénovirus de type 2 d'après Everitt, Lutter et Philipson (1975)



L'adénovirus (T = 25) se présente comme un virus constitué de capsomères (252) qui ne sont pas tous identiques. Les capsomères situés aux sommets sont dans une position d'ordre 5, entourés de cinq autres capsomères. Ils sont appelés pentons et sont composés de deux protéines différentes: la base du penton insérée dans la capside et une projection extérieure, la fibre. Ceux situés sur les faces et les arêtes sont entourés de six autres molécules, ce sont les hexons. Il sera montré plus loin qu'au moins quatre autres protéines doivent intervenir dans l'architecture de la capside.

## 2. Les protéines de la capside

L'adénovirus est entièrement dissocié par chauffage à 100 °C en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu dissociant permet de mettre en évidence 14 polypeptides différents dans l'adénovirus de type 2 dissocié. Ils sont numérotés de II à XII suivant leur migration en gel (Maizel et al., 1968; Anderson et al., 1973).

Par pontages réversibles, réactions immunologiques et marquages spécifiques, ces polypeptides ont pu être identifiés et localisés dans le virion et dans ses sousstructures obtenues par dégradation séquentielle. Un modèle topographique a été proposé par Everitt et al. (1975) (figure 3).

Lors de l'infection virale, la cellule synthétise certaines des protéines virales en excès. Il est donc possible de les purifier en quantité suffisante pour des études structurales. La composition en acides aminés est connue pour la plupart d'entre elles (tableau 2), ainsi que la séquence complète pour la protéine IX (Aleström et al., 1980), l'hexon (Jörnvall et al., 1981), la fibre (Herissé et al., 1981) et la protéine VII (Sung et al., 1983).

	II (1)	III (2)	IIIa (3)	IV (4)	V (5)	V (6)	í (7)	VII (8)	VIII (9)	IX (10)
Lys	3.9	6.8	2.3	5.8	6.5	5.4	1.6	2.9	1.8	1.4
His	1.5	1.9	1.9	0.9	0.4	traces	2.5	2.3	2.4	0.0
Arg	4.7	5.3	5.2	2.0	11.9	6.2	6.3	23.0	5.5	5.8
Asp	14.6	10.4	10.2	13.1	6.4	8.8	5.4	5.8	7.0	8.6
Thr	6.9	6.1	5.8	10.7	9.1	6.8	3.7	6.9	4.8	8.6
Ser	6.3	6.0	10.4	11.7	5.5	9.0	22.4	3.5	20.0	15.8
Glu	9.4	12.1	11.8	6.0	12.1	12.4	13.5	3.5	13.1	6.5
Pro	5.9	5.8	8.3	5.8	9.3	10.4	1.5	6.9	5.1	5.8
Gly	6.8	7.3	10.8	8.0	6.6	9.8	25.8	6.4	20.0	4.3
Ala	7.2	7.9	8.5	6.3	9.5	8.7	8.0	19.0	9.1	16.5
Val	5.7	6.1	5.3	5.7	9.1	8.2	3.0	9.8	3.0	7.2
Met	2.9	2.0	1.2	2.1	0.5	0.5	0.4	1.7	0.5	1.4
Ile	3.5	4.2	3.5	5.5	2.6	3.6	1.5	2.3	2.3	2.2
Leu	7.9	9.2	7.4	9.6	8.8	8.7	2.2	2.3	2.7	11.5
Tyr	5.9	3.2	3.4	2.9	0.7	traces	0.7	2.3	1.3	1.4
Phe	4.6	3.8	4.0	2.9	1.0	1.6	0.8	0	0.7	2.1
Trp	1.3	0.9	ND	0.7	ND	ND	ND	1.1	ND	0.7
1/2Cys	0.7	1.0	ND	0.5	NF	NF	ND	0	ND	0.0

Jörnvall et al., 1981 (séquence)
 Boudin et al., 1979
 Lemay et al., 1980
 Hérissé et al., 1981 (séquence du gène)
 Laver, 1970
 Laver, 1970
 Everitt et al., 1974
 Sung et al., 1983 (séquence du gène)
 Everitt et al., 1974
 Aleström et al., 1980 (séquence du gène)
 ND non déterminé
 NF non trouvé

BUS

#### TABLEAU 2

Composition en acides aminés des polypeptides de l'adénovirus de type 2.

a. L'hexon (polypeptide II) et les protéines associées.

L'hexon de type 2 (Franklin et al., 1971) et l'hexon de type 5 (Cornick et al., 1971) ont été cristallisés. Ces études ont bien établi leur caractère trimèrique . Le poids moléculaire du polypeptide hexon de type 2 a été calculé à partir de sa séquence: 108000 (966 acides aminés, Jörnvall et al., 1981). Son extrémité N-terminale est acétylée. A partir données de diffraction de rayons X sur des cristaux des d'hexon de type 2, une carte de densité à 6 Å a été calculée (Berger et al., 1978). Elle donne la forme de la molécule en accord avec les observations de la microcopie électronique (Nermut, 1975; 1979; figure 4). La molécule d'hexon présente une base pseudo-hexagonale de 52 Å de côté avec une ouverture d'environ 30 Å de diamètre, et centrale มท sommet triangulaire (80 Å de côté) avec un petit orifice de 10-15 Å de diamètre. La hauteur totale est d'environ 110 Å. De plus ces études confirment les mesures de dichroïsme circulaire en montrant qu'il existe très peu de structure secondaire (tableau 3, Day et al., 1972; Boulanger et Loucheux-Lefebvre, 1972).

Les hexons sont des protéines fortement immunogènes. Trois sortes de déterminants antigéniques sont présents sur la molécule: des déterminants communs à tous les adénovirus (spécificité de groupe), communs aux adénovirus d'un même sous-groupe (spécificité de sous-groupe) et enfin spécifiques du sérotype. Seuls les déterminants de type sont accessibles à la surface du virus (Pettersson et al., 1971). Les anticorps anti-type neutralisent le pouvoir infectieux viral (Norrby, 1969a).

les capsomères majoritaires Les hexons sont de la<sup>·</sup> capside dans laquelle ils existent avec des environnements différents. La dialyse du virus à basse force ionique et рH 6-6,5 provoque le départ des pentons (Laver et al., 1969): la particule virale prend alors un aspect sphérique et le DNA interne devient sensible aux DNAses. Après quelques heures à température ambiante, les cinq hexons entourant le penton à chaque sommet (les hexons péripentonaux) sont également dissociés de la capside. Ils entrainent avec eux la protéine IIIa (Prage et al., 1970 ; Everitt et al., 1975). La capside







b











F

Figure 4

Modèles d'Hexon



- a. d'après la carte de densité électronique à 6Å
   (Berger et al., 1978).
- b. d'après la microscopie électronique (Nermut et Perkins, 1979).

	Structure							
Proteine	Hélice	feuillet	inordonnée					
Hexon (1)	17%	26%	56%					
(2)	20 - 30%	30 - 40%	40%					
Fibre (2)	< 10%	50 <b>-</b> 60%	40%					

#### TABLEAU 3

Pourcentages de structures secondaires déterminés par dichroïsme circulaire.

(1) Day et al. 1972

(2) Boulanger et Loucheux-Lefebvre, 1972.



(f) Rings of five, forming shell



Groupes de 9 hexons et réassociation de groupes de 9 hexons d'après Pereira et Wrigley (1974).



•

résiduelle est alors stable. Il faut chauffer à 56 °C en présence d'un détergent, par exemple le désoxycholate de sodium (DOC, Russell et al., 1971), pour casser cette capside en groupes de 9 hexons et libérer les nucléoïdes. Les groupes de 9 hexons (figure 5) constituent les 20 faces plates de la capside icosaédrique. Ils possèdent un axe de symétrie d'ordre 3 en leur centre. Chaque groupe de 9 est composé de 9 molécules d'hexons et d'environ 15 copies de protéine IX (Boulanger et al. 1979) de poids moléculaire 12000 en gel-SDS. Ces groupes de 9 peuvent se réassocier à pH 6 dans un tampon 0.1 М phosphate. La figure 5 montre les types de réassociation observés en microscopie électronique. Quelques capsides vides, dépourvues des protéines de l'apex, ont été mises en évidence par sédimentation à l'équilibre (Pereira et Wrighley, 1974). La protéine IX ne semble pas indispensable à la construction de la capside. Un mutant de délétion (dl 313) ne synthétisant pas de IX, peut assembler une capside. Celleest peu stable et ne produit pas de groupes de 9 lors de ci sa dégradation (Jones et al., 1978; Colby et Shenk, 1981).

D'autres protéines sont trouvées associées aux hexons. La protéine VI (PM en gel-SDS: 24000), isolée sous forme d'un dimère (Everitt et Philipson, 1974) et qui est souvent présente dans les préparations de groupes de 9, mais qui peut être libérée par traitement avec 0.15 M NaCl, et la protéine (PM en gel-SDS: 13000). Les expériences de VIII pontage al., 1975) montrent que la protéine (Everitt et VI est associée à tous les hexons de la capside alors que la protéine VIII n'est associée qu'aux hexons des faces. Quand elles sont assemblées dans le virus, les protéines VI et VIII ne réagissent pas avec leurs anticorps spécifiques alors que la protéine IX a une faible activité immunologique. La VI et seraient à l'intérieur de la capside et la VIII la IX pourrait être accessible de l'extérieur, bien que sa réactivité augmente considérablement quand la capside est dissociée.

b.La protéine IIIa.

Lors de la dégradation de la capside la protéine IIIa est libérée en même temps que les hexons péripentonaux. C'est la seule protéine structurale de l'adénovirus qui soit phosphorylée (Russell et Blair, 1977). Son poids moléculaire est de 66000 et il s'agit d'un monomère (Lemay et al., 1980) Dans le virus la protéine IIIa réagit efficacement avec ses anticorps spécifiques.Elle peut être pontée avec l'hexon. le penton et une protéine interne: la protéine VII (liée au DNA; Everitt et al., 1975).

c. Le penton

penton est composé de 2 protéines: la base (III, PM Le gel-SDS: 85000) et la fibre (IV, 62000), associées en de façon non-covalente . Par dialyse à basse force ionique , le penton complet est libéré du virus. Pour séparer la base de fibre il faut utiliser des traitements plus forts: la chlorhydrate de guanidine 2,5 M, pyridine 20% (Norrby and Shaaret, 1967), désoxycholate de sodium (Boudin et al., 1979), mais la structure oligomérique des protéines est alors Dans la cellule la fibre et le penton complet sont altérée. trouvés en excès, mais pas la base du penton. Celle-ci a pu être isolée à partir de mutants thermosensibles  $(H_{2}ts)$ 115, H<sub>2</sub>ts 125), défectifs pour la synthèse de la fibre (Boudin et al., 1979).

La fibre apparaît en microscopie électronique comme un bâtonnet terminé par une sphérule. Sa longueur varie considérablement d'un sérotype à l'autre (100 à 300 Å environ). Pour le type 2 la longueur est environ 250 Å, la largeur 20 Å et le diamètre de la sphérule de 40 Å (Valentine et Pereira, 1965). La fibre est glycosylée, 2 molécules de Nacétyl-glucosamine étant déterminées par fibre (Ishibashi et Maizel, 1974a). La fibre de type 5 a été cristallisée par Mautner et Pereira, 1971.

A l'inverse du penton qui est sensible à la protéolyse spontanée, la fibre ne semble pas altérée par l'hydrolyse trypsique (Pereira et Skehel, 1971). In vitro la fibre peut s'assembler avec la base du penton extraite des mutants à des pН et des forces ioniques variables. L'action de la carboxypeptidase Y ou A sur la fibre provoque une perte d'environ 20 acides aminés. Dans ces conditions la fibre est incapable de s'assembler à la base. Il semble donc que l'extrémité C-terminale soit impliquée dans l'association avec la base du penton. Le résidu glucosamine ne paraît pas affecté par cette dégradation (Boudin et Boulanger, 1982).

La base du penton possède des déterminants antigéniques communs à tous les adénovirus (spécificité de groupe) et d'autres spécifiques du sous-groupe, mais elle ne possède pas de spécificité de type (Wilcox et Ginsberg, 1961; Norrby, 1966). Elle est responsable de l'effet cytopathogène précoce (détachement et agrégation des cellules infectées qui sont cultivées en monocouche)(Pettersson et Höglund, 1969).

deux La fibre contient sortes de déterminants: spécifiques du sérotype, localisés sur la sphérule terminale (Pereira et de Figueredo, 1962) et spécifiques du sous-groupe, le long de la tige. Les derniers ne sont présents que sur les fibres les plus longues (sousgroupes B et C). L'extrémité renflée de la fibre est responsable des réactions d'hémagglutination (Rosen, 1960; Norrby, 1969b).

La fibre se fixe sur les récepteurs membranaires de la cellule (environ 10<sup>4</sup> sur une cellule KB) (Philipson et al., 1968; Hennache et Boulanger, 1977). Les anticorps anti-fibre provoquent la dissociation du penton en base et fibre, l'effet étant plus prononcé avec des anticorps anti-sousgroupe. Un changement conformationnel de la fibre peut expliquer cet effet (Boudin et Boulanger, 1981).

## II STRUCTURE DU DNA VIRAL

Le génôme des adénovirus est une molécule de DNA double brin, linéaire, de 35000 paires de bases (pour le sous-groupe Green, 1970 ). Les sites de coupure pour plus de 12 с; endonucléases de restriction sont actuellement bien établis. grandes portions du génôme du type 2 ont été séquencées De (Aleström et al., 1980; Herissé et al., 1981; Herissé et Galibert, 1981; Jörnvall et al., 1981; Gingeras et al.. 1982). Une séquence terminale répétitive inversée est présente aux deux extrémités du génôme (Garon et al., 1972; Roberts et al., 1974). Le DNA extrait par le chlorhydrate de guanidine 4M est circulaire. Une protéine (PM 55000) est responsable de cette circularisation (Robinson et Bellett, 1974). Elle est liée à chacune des extrémités 5' du DNA par un résidu désoxycytidine (Rekosh et al., 1977). Le phénomène d'épissage (ou "splicing") des RNA a été pour la première fois observé pour les adénovirus (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977) avant de l'être pour les cellules eucaryotes. a permis de mettre en évidence la présence d'introns I1 (séquences non traduites) sur le DNA, ainsi que la possibilité de plusieurs cadres de lecture de gènes donnant naissance à la synthèse d'un plus grand nombre de protéines virales .

## III ORGANISATION DU NUCLEOIDE

Différentes méthodes existent pour extraire les nucléoïdes du virus: traitement à l'acétone (Laver et al., 1968), à la pyridine 10% (Prage et al., 1968), par des détergents comme le sarcosyl (Brown et al., 1975) ou le DOC (Russell et al., 1971).

Le nucléoïde contient une molécule de DNA viral circularisée par la protéine 55000, 1070 copies de protéine VII et 180 de protéine V (Everitt et al.1975). La protéine VII (PM en gel-SDS 18500) est retrouvée dans toutes les préparations de nucléoïdes ; elle est riche en arginine (23%) et en alanine (19%) (Laver et al., 1970; Sung et al., 1983). L'examen de sa séquence montre quatre domaines très basiques, trois d'entre eux présentent des similitudes de structure avec les histones et le quatrième avec les protamines (Sung 1983). La protéine V (PM en gel-SDS: et al., 49500) est détachée du nucléoïde par traitement au sarcosyl. Certains auteurs (Hosakawa et Sung, 1976; Vayda et al., 1983) décrivent une protéine  $\mu$  associée avec le DNA (PM en gel-SDS: 4000-6000) riche en arginine (54%) et relativement peu représentée (125 copies/virion).

En microscopie électronique les nucléoïdes apparaissent comme des structures compactes et sphériques de diamètre 660-670 Å (Brown et al., 1975). L'absence de protéine V rend leur structure moins compacte, et des sphérules (8 à 10) de 216 Å de diamètre sont visibles. Après dialyse à basse force ionique, le nucléoïde apparaît comme une fibre épaisse de 200 Ă de diamètre (Nermut, 1980; Vayda et al., 1983). Des "billes" sont également observées structures en en microscopie électronique (Mirza et Weber, 1982). en particulier lorsque le nucléoïde est dépouvu de protéine V et par 0.4 M NACl (Vayda et al., 1983). traité Corden et al. (1975) suggèrent une structure de type nucléosomique pour le nucléoïde d'adénovirus. Les expériences réalisées à l'aide de la nucléase micrococcale, ne réussissent pas à reproduire le diagramme de digestion (200 paires de bases) la chromatine des eucaryotes caractéristique de (Tate et Philipson, 1979). Les produits de digestion du nucléoïde sont hétérogènes, mais semblent toujours plus petits que le DNA des nucléosomes cellulaires. Des monomères de 11S sont néanmoins mis en évidence : ils contiendraient 150 paires de bases et 6 copies de la protéine VII (Mirza et Weber, 1982). Les morceaux de DNA reliant ces monomères semblent être de la protéine V servant à maintenir longueur variable, l'ensemble de la structure du nucléoïde (Boulanger et Loucheux-Lefebvre, 1982).

IV INFECTION DE LA CELLULE PAR UN ADENOVIRUS

Lorsque le virus pénètre dans une cellule, plusieurs cas peuvent se présenter:

- <u>cycle lytique</u>: si la cellule est permissive (cellules humaines HeLa ou KB poussant en lignée continue pour les sérotypes humains, par exemple) les virus se multiplient et lysent la cellule pour être libérés;
- cycle abortif: si la cellule est non permissive, (cellules de singes AGMK et virus humains , par exemple) il y a synthèse de protéines précoces, de DNA viral et de certaines protéines tardives, mais il n'y a pas de production virale;
- <u>transformation</u>: seuls certains adénovirus peuvent provoquer des tumeurs chez les hamsters nouveau-nés (voir classification), mais tous peuvent transformer les cellules de rat embryonnaire "in vitro" (Freeman et al., 1976). La transformation implique l'intégration au génôme cellulaire de séquences virales ( à peu près 15% de l'extrémité gauche du génôme viral ; Van der Eb et al. 1979), et l'expression de protéines précoces.Nous nous contenterons ici, de résumer les grandes étapes du cycle lytique.

1. Fixation et pénétration du virus

La particule virale se fixe par la fibre à un récepteur cellulaire (Philipson et al., 1968) composé de trois espèces polypeptidiques majeures (78000, 60000, 42000; Hennache et Boulanger, 1977). Le virus pénètre dans le cytoplasme par remaniement de la membrane cellulaire (Hennache et al., 1979) et quand il est retrouvé, il a perdu 5% de son poids en protéines, probablement les pentons (Sussenbach, 1967). La particule migre alors vers le noyau dans lequel le DNA est injecté, sans doute sous forme de nucléoïde(Morgan et al., 1969). Le DNA viral parental observé dans le noyau ,3 à 6 h après l'infection , semble organisé comme la chromatine cellulaire (Sergeant et al., 1979; Tate et Philipson, 1979; Vayda et al., 1983) alors que ce n'est pas le cas dans le nucléoïde. Il y aurait donc un changement d'organisation du DNA lors du passage de la membrane nucléaire ou dans le noyau, par substitution des protéines internes virales (V et VII) par des histones cellulaires (Tate et Philipson, 1979).

## 2. Phase précoce

Les mRNA précoces sont synthétisés à partir de cinq régions du génôme. Après leur synthèse les RNA sont "coiffés" (CAP, Hashimoto et Green, 1979), une séquence poly A est ajoutée et finalement ils subissent un épissage ("splicing") (Berk et Sharp, 1978).

Plusieurs protéines précoces sont mises en évidence (jusqu' à 13, de 72000 à 10500 de PM en gel-SDS, Harter et al., 1976; Saborio et Oberg, 1976. Harter et Lewis, 1978). Leur rôle n'est pas connu, excepté pour la protéine 72000 qui présente de l'affinité pour le DNA simple brin (Van der Vliet et Levine, 1973).

## 3. Réplication et phase tardive

réplication du DNA viral a lieu dans le noyau de la La cellule (Simmons et al., 1974) sans intégration au génôme cellulaire. Elle commence 6 à 8h après l'infection et utilise les DNA polymérases ∝ et%de la cellule (Krokan et al., 1979). protéine de 72000 intervient dans l'initiation etLa l'élongation des chaînes (Van der Vliet et Sussenbach, 1975; et al., 1977), et la protéine der Vliet de Van circularisation (55000) dans l'initiation. En même temps que la réplication s'effectue, les RNA tardifs sont synthétisés dans le noyau sous forme de longs précurseurs, les hnRNA. Ces subissent les mêmes modifications que les mRNA précoces RNA avant leur transport vers le cytoplasme (voir revue générale: Nevins et Chen-Kiang, 1981). Les protéines tardives structurales sont alors synthétisées ainsi que les protéines virales non-structurales, comme la protéine 100K (PM 100000) qui pourrait jouer un rôle dans la trimérisation de l'hexon (Ginsberg et al., 1974; Gambke et Deppert, 1981; Cepko et Sharp, 1982). La plupart des polypeptides de structure possèdent une extrémité N-acétylée (hexon, fibre, pVI, pVII; Jörnvall et al., 1974; Sung et al., 1977). Certains subissent des modifications après leur synthèse: le IIIa et le 100K sont phosphorylés (Russell et Blair, 1977), les protéines pIIIa, pVI, pVII et pVIII sont clivées en IIIa, VI, VII et VIII (Anderson et al., 1973; Boudin et al., 1980).

5. Morphogénèse du virion

La morphogénèse des particules virales s'effectue à partir de leurs éléments constitutifs : DNA et protéines. Le processus de l'assemblage peut être étudié :

<u>in vivo</u>: à l'aide des particules défectives produites au cours de l'infection. Ces particules sont parfois plus faciles à isoler à partir de mutants thermosensibles, qui, bloqués à certaines étapes de l'assemblage, accumulent les produits de l'étape précédente;

<u>in vitro</u>: par l'étude des interactions DNA-protéines et protéines-protéines, et par la reconstitution de la capside et l'encapsidation du DNA.

a. Les particules incomplètes.

En gradient de chlorure de césium, le virus mature a une densité de 1,34g/cm<sup>3</sup> et des particules de densité plus faible apparaissent  $(1,297-1,307g/cm^3)$ . Ce sont des capsides vides ou partiellement vides, contenant des morceaux de DNA de longueur variable suivant le sérotype étudié et la méthode de préparation. D'une façon générale, l'extrémité gauche du génôme est toujours présente: 12 à 18% du DNA viral pour Ad<sub>3</sub> (Daniell, 1976) et Ad<sub>7</sub> (Tibbetts, 1977), 25 à 30% pour Ad<sub>2</sub> et Ad<sub>12</sub> (Burlingham et al., 1974). Parfois un fragment de DNA viral est lié de façon covalente à un fragment de DNA cellulaire (Ad<sub>2</sub>: Tjia et al., 1977; Ad<sub>16</sub>: Hammarsköld et al., 1977).

Les particules imcomplètes apparaissent 10h après l'infection (Rosenwirth et al., 1974) et elles sont capables d'évoluer en virus matures (Sundquist et al., 1973). Préparées en chlorure de césium elles sont très fragiles et l'emploi de techniques plus douces de purification (Ficoll, Métrizamide), ainsi que la fixation des capsides par des agents de pontage, sont souvent nécessaires.

D'Halluin et al. (1978) isolent en gradient de saccharose et après consolidation des particules par pontage réversible à l'aide d'un di-imido-ester clivable, des particules de densité 1,315, 1,370 et 1,345g/cm<sup>3</sup> . Les particules 1,315 sont les seules assemblées à température non permissive par le mutant Hots112. Elles ne possèdent ni les protéines du nucléoïde V et VII, ni les protéines VI et VIII, les précurseurs pVI et pVIII et 2 protéines nonmais structurales (39K et 50K). En revanche, elles contiennent un petit morceau de DNA 7-11S, constitué de séquences virales et cellulaires variables. Les protéines 39 et 50K pourraient servir à l'assemblage.

Les particules 1,370 (600S) contiennent du DNA mature (34S), mais pas les protéines V etVII, et elles ont perdu les protéines 39 et 50K. Au contraire, Edvardsson et al. en 1976 isolent en gradient de Ficoll des particules( 550-670 S ) plus légères que le virus (750S), possédant toutes les protéines du virus ou leurs précurseurs, ainsi que les protéines 39 et 50K.

b. Jeunes Virions

Des marquages courts à la 11e heure, suivis de chasse jusqu'à la fin du cycle, permettent de mettre en évidence des particules qui présentent toutes les caractéristiques du virus (d = 1.34, 750S, DNA 34S), mais en diffèrent par l'absence de clivage de ses précurseurs pVI, pVII et pVIII (Ishibashi et Maizel, 1974b). La dernière phase de



## Figure 6

Schéma d'assemblage de la particule infectieuse d'après D'Halluin (1980). La composition en polypeptides est indiquée en dessous de chaque particule.

.

l'assemblage est une étape de maturation par clivage protéolytique. L'existence de mutants thermosensibles bloqués avant ce clivage, a permis de noter l'absence d'une protéase nécessaire à la maturation de pVII en VII ( $H_2$ ts1; Bhatti et Weber,1979). Certains mutants de ce type ne semblent pas posséder de nucléoïdes ( $H_2$ ts104 ;D'Halluin et al.1980).

schéma d'assemblage du virus est proposé Un par D'Halluin (1980, figure 6). La capside est préformée à partir des protéines synthétisées par la cellule, puis le DNA est encapsidé probablement sans les protéines V et VII ou pVII. bien que certains auteurs pensent qu'il soit déjà sous forme de nucléoïde (Edvardsson et al., 1976; Philipson. 1979). Une association stable a été réalisée in vitro entre capside vide et l'extrémité gauche du DNA double brin la (Tibbetts et Giam, 1979). La conformation du DNA ,ou son changement de conformation , joue un rôle important lors de son encapsidation (D'Halluin et al., 1980). Après formation nucléoïde, les précurseurs subissent un clivage et la du particule devient infectieuse.

## LA STRUCTURE

La connaissance détaillée de la structure d'un virus doit nous apporter des informations sur les différents composants de ce virus (protéines, acides nucléiques, lipides et sucres éventuellement), sur leur localisation et leur arrangement dans le virus, ainsi que sur les interactions mises en jeu. Ces informations, recueillies sur tous les intermédiaires disponibles, depuis les protéines nouvellement synthétisées jusqu'aux virus matures, devraient permettre de comprendre par quelles étapes structurales s'effectue la morphogénèse du virus dans la cellule.

La détermination de la structure d'une molécule biologique peut se faire à plusieurs niveaux:

- étude de l'enchaînement covalent des résidus ( acides aminés ou nucléotides ) : c'est la structure primaire ou séquence. Elle impose des contraintes qui définissent la façon dont la molécule va se replier pour atteindre sa conformation finale;
- description des régions ordonnées de la molécule: parties en hélice ou en feuillet plissé des protéines, simple ou double hélice du DNA. C'est la structure secondaire;
- structure tridimensionnelle décrivant l'arrangement dans l'espace de l'ensemble de la molécule, c'est la structure tertiaire ou conformationnelle. Elle donne des indications sur les résidus accessibles à la surface, donc sur les possibilités d'interactions avec les molécules voisines;
- association non covalente des molécules: structure oligomérique ou quaternaire. Elle est indispensable à l'activité biologique.

Pour les petites molécules, une information structurale à l'échelle atomique est facilement accessible, mais pour des systèmes plus complexes comme les virus, obtenir ce genre d'informations est un énorme travail qui suppose la possibilité d'avoir des monocristaux. Ceci a été fait pour des petits virus comme le TBSV, le SBMV et le STNV, mais pas encore pour l'adénovirus.
L'approche de la structure d'un système complexe consiste donc à obtenir en premier lieu des renseignements sur sa morphologie, sa composition chimique et les interactions de ses différents éléments. Les études plus approfondies sont concentrées sur les composants qui peuvent être cristallisés et présentent un intérêt structural ou fonctionnel, hexon et fibre par exemple.

## LES TECHNIQUES UTILISEES

Aucune technique à elle seule n'est capable de rendre compte de l'ensemble d' une structure: c'est l'accumulation des résultats obtenus par diverses approches qui va permettre d'élaborer un modèle cohérent, représentatif de la réalité.

L'étude de la structure des virus s'est réalisée par la microscopie électronique, qui donne directement une image du virus, et par la diffraction de rayons X quand des cristaux étaient disponibles (Revues: Finch et Holmes, 1967; Finch, 1972; Harrison, 1980). Plus récemment, l'application de la diffusion de neutrons à l'étude des virus en solution a permis d'obtenir des modèles à basse résolution (Revues: Jacrot, 1981; Timmins et Jacrot, 1983).

L'étude structurale des adénovirus s'est effectuée essentiellement par microscopie électronique (Horne et al., 1959; Valentine et Pereira, 1965; Nermut, 1975, 1980). Les détails structuraux ont été obtenus par des approches indirectes:

- enzymatique: l'action des enzymes (protéases ou nucléases) informe sur l'accessibilité ou la protection de certains sites de la particule;
- immunologique: accessibilité des protéines ou de certaines zones de la particule aux anticorps;
- chimique: les réactions de pontage donnent des renseignements sur les relations de voisinage.

Nous avons vu au paragraphe  $I_2$  que la plupart des protéines de l'adénovirus ont été isolées et purifiées. Leur composition en acides aminés et la séquence de quatre d'entre elles sont connues. La détermination de la séquence du DNA est très avancée et l'on peut penser que celle des autres protéines le sera bientôt . Pour l'instant, seule la protéine hexon a été cristallisée et sa structure tridimensionnelle à 2,9 Å de résolution est en cours d'étude (Burnett et al., 1981).

Il nous a donc semblé intéressant d'utiliser pour l'étude de la structure de l'adénovirus, différentes techniques physiques. Nous allons, avant de présenter nos résultats, donner quelques éléments de théorie et d'application de ces techniques .



Rayonnement	Longueur d'onde O (A)	Energie ev	Elément diffuseur	Libre parcours <sup>1)</sup>
Photons	5000	2.	électrons	variable
Rayons X	1,5	8.10 <sup>3</sup>	électrons	100µm
Neutrons	1 à 10	$10^{-3} - 10^{-2}$	neutrons	1 mm
Electrons	0,05-0,01	10 <sup>5</sup>	électrons	0,1 à 1 µm

### TABLEAU\_4

Différents types de rayonnements utilisés pour l'étude des structures biologiques.

1) Le libre parcours moyen des particules donne l'ordre de grandeur des échantillons observables par transparence.

Ce chapitre est largement inspiré des revues suivantes: - Neutrons: Jacrot (1976)

Timmins et Jacrot (1983)

Cuillel (1981)

- Neutrons et rayons X: Jacrot (1981)

```
- Poids moléculaires: Jacrot et Zaccaï (1981)
```

Zaccaï et Jacrot (1983)

- Techniques physiques: K.E. Van Holde (1971)
- Microscopie électronique: R.W. Horne (1977)

## I. DIFFUSION ET DIFFRACTION (PRINCIPE)

Etudier la structure d'un objet revient à en donner une image dans l'espace, la plus détaillée possible. Pour observer l'objet, différents types de rayonnements peuvent être employés (tableau 4). Quand le rayonnement arrive sur les molécules de l'échantillon, deux cas peuvent se présenter:

- il est absorbé et il transmet alors de l'énergie à la molécule: c'est la diffusion inélastique utilisée en spectroscopie (fluorescence, infra-rouge). Les informations sont d'ordre dynamique;
- il est diffusé et il n'y a pas de transfert d'energie: c'est la diffusion élastique (diffusion centrale ou diffraction). Les renseignements sont alors purement structuraux. Dans le cas de la lumière ou des électrons les ondes sont observées à travers un système optique (lentilles) qui permet de les recombiner pour former une image (microscopie optique ou électronique), alors que dans le cas des rayons X ou des neutrons il n'existe pas de tel système d'observation directe de l'objet. Il faut mesurer sur un détecteur la distribution spatiale de l'intensité des ondes diffusées. L'information structurale est alors obtenue par des calculs utilisant ces intensités.

Page 23

Dans une solution, les molécules (virus ou protéines) ont une orientation alléatoire les unes par rapport aux autres, et la diffusion du rayonnement peut être considérée comme due à une macromolécule isolée. Les intensités recueillies seront une moyenne représentant toutes les orientations de la particule.

Au contraire, dans un cristal (ou dans un gel orienté), toutes les molécules sont ordonnées dans une même direction. L'information contenue dans le cristal est la même que dans une solution, mais, grâce à l'orientation identique des particules, les intensités s'ajoutent et la précision de l'information est d'autant plus augmentée que le cristal (ou l'étendue de la partie ordonnée) est grand. Dans ce cas le rayonnement est diffracté (électrons, rayons X ou neutrons).

## II. DIFFUSION DE NEUTRONS ET DE RAYONS X PAR DES VIRUS EN SOLUTION

Quand les molécules d'une solution diffusent les rayons X ou les neutrons, chaque atome de la molécule a une probabilité donnée de diffusion qui est caractérisée par un nombre b (longueur de diffusion). Pour les rayons X, b est proportionnel au nombre d'électrons de l'atome alors que pour les neutrons, la diffusion est due aux noyaux et la masse de l'atome n'intervient pas (tableau 5).

A angle nul, l'intensité des ondes diffusées est maximale puis elle diminue pour des angles de plus en plus grands suivant l'échantillon et les conditions expérimentales. La variation de l'intensité est décrite en fonction du vecteur de diffusion q qui indique la direction de l'observation.

$$q = \frac{4\pi}{\lambda} \sin \theta_{\bullet}$$

où  $\lambda$  est la longueur d'onde du rayonnement incident,

 $2\theta$  est l'angle de diffusion.

Le virus peut être considéré comme une distribution de matière diffusante  $\rho(\vec{r})$  en solution dans un solvant de densité  $\rho$ s.  $\rho(\vec{r})$  est la densité au point de coordonnée  $\vec{r}$  dans le virus. Pour un objet sphérique,  $\rho$  est la même pour

tous les points r situés à une même distance r du centre. Une relation mathématique, appelée transformée de Fourier, existe  $entre \rho(r)$  et le vecteur de diffusion q.

(1)  $F(q) = o \rho(r) - \rho_s \frac{\sin qr}{qr} \times 4 \pi r^2 dr$ 

Le facteur  $F_{(q)}$  peut être déduit des intensités  $I_{(q)}$  mesurées expérimentalement.

(2)  $I_{(q)} = F_{(q)}^{2}$ 

Dans ce cas il reste à connaître le signe de  $F_{(q)}$ (qui est + ou -) et  $\rho_{(r)} - \rho_s$  est calculé en inversant la relation (1).

(3) 
$$P(r) - P_s = o \int F(q) \frac{\sin qr}{qr} \times \frac{1}{\pi} q^2 dq$$

La variation de I en fonction de q présente un maximum de diffusion au centre et une série de maxima et minima (illustrée à la figure 3 de l'article 4) qui dépendent de la dimension du virus et de la distribution de la matière à l'intérieur de la particule.

La contribution des termes non sphériques des virus icosaédriques va limiter l'approximation sphérique à l'étude de 3 ou 4 maxima pour les petits virus (150 Å de rayon) alors que pour les gros virus, l'approximation reste valable pour un plus grand nombre de maxima.

# 1. Variation de contraste

La différence  $\rho_{(r)}$ - $\rho_s$  représente le contraste, c'est à dire la différence de densité de diffusion entre le virus et le solvant qui l'entoure. Cette différence varie suivant le Si les composants viraux ne sont pas solvant utilisé. hydratés p (r) dépend de la composition chimique et des spécifiques des différents constituants (acides volumes nucléiques, protéines, lipides). Une forte hydratation 'a réduire la densité de la matière et  $\rho_{(r)}$ - $\rho_s$  ne donne plus composition chimique au rayon directement la r. L'information chimique pourra être obtenue si la densité du Amplitude de diffusion de différents atomes

Hydrogène-0,37420,28Deutérium0,66710,28Carbone0,65511,67Azote0,94001,97Oxygène0,58042,25Sodium0,36003,10Magnesium0,52003,38Phosphore0,28004,23Soufre0,96004,79Potassium0,37005,36Calcium0,47005,64	

pour les neutrons et les rayons X.



a

Densités de diffusion de différents composés.

	Neutrons	Rayons X
$H_{20}$ $D_{20}$ Protéine dans $H_{20}$ Protéine dans $D_{20}$ RNA dans $H_{20}$ RNA dans $D_{20}$ DNA dans $H_{20}$ DNA dans $H_{20}$ DNA dans $D_{20}$	-0,562 6,404 1,800 3,100 3,540 4,550 3,540 4,290	9,40 9.40 12,00 12,00 15,70 15,70 15,00 15,00

## TABLEAU 5

- a. Les amplitudes de diffusion pour différents atomes sont  $X10^{-12}$  cm.
- b. Les densités de diffusion de différents composés sont  $X10^{-14}$  cm/Å.
- (D'après Jacrot, 1981).

AUS

solvant ( $\rho_s$ ) varie, faisant ainsi varier le contraste des différents composants du virus.

Pour réaliser la variation de contraste avec les rayons il est nécessaire d'utiliser de fortes concentrations de Χ. sels ou de saccharose (Harrison, 1969; Luzzati et al., 1976). Cette nécessité peut entraîner la déstabilisation du virus et modifier sa structure et son état d'hydratation. A fortes concentrations, le milieu n'est plus homogène. Les sels ou le pénètrent peu ou pas "l'enveloppe d'hydratation" sucrose entourant les macromolécules. Ceci est particulièrement vrai pour les acides nucléiques qui sont très hydratés et qui peuvent alors être confondus avec les protéines. De plus l'annulation de la densité des acides nucléiques ne peut pas être entièrement obtenue.

Les neutrons sont diffusés différemment par l'hydrogène et le deutérium (voir tableau 5). La différence entre les pouvoirs diffusants de H<sub>2</sub>O (-0.562 x 10<sup>-14</sup> cm/Å<sup>-3</sup>) et de D<sub>2</sub>O (6.404 x 10<sup>-14</sup> cm/Å<sup>-3</sup>) est utilisée pour l'étude de la structure des virus. Le solvant (H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O) pénètre facilement dans les particules. Il est possible de trouver le mélange H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O ayant le même pouvoir diffusant que chacun des constituants du virus. Le contraste entre le constituant et le solvant disparaît,  $\rho_{(r)}$ - $\rho_s$  représentant approximativement la contribution des autres constituants viraux.

La figure 7 montre que pour 41% de  $D_20$  la contribution de la protéine est annulée (pourcentage qui varie légèrement suivant la composition en acides aminés et le volume spécifique). A 69% c'est le RNA qui disparaît et à 65%, le DNA. La présence de sel dans le solvant, à concentrations usuelles (0,1-0,2 mM), modifie peu son pouvoir diffusant, ce qui n'est pas le cas avec les rayons X.



Variation des densités de longueur de diffusion dans le cas des neutrons en fonction du pourcentage de D<sub>2</sub>O.

BUS

2. Analyse des données de la diffusion de neutrons.

(Jacrot et Zaccaï, 1981; Timmins et Jacrot, 1983). Le résultat d'une expérience typique de diffusion de neutrons aux petits angles par un virus sphérique est une série de courbes I(q) en fonction de q pour différents mélanges  $H_{2}O/D_{2}O_{*}$ 

a. Approximation de Guinier: I<sub>0</sub>,Rg.

Si les mesures sont réalisées à très petits angles, la courbe de l'intensité est représentée par une loi exponentielle en fonction du rayon de giration Rg (Guinier et Fournet, 1955).

(4)  $I_{(q)} = Io \exp(-\frac{1}{3} Rg^2 q^2)$ 

Le logarithme (Ln) de  $I_{(q)}$  en fonction de  $q^2$  donne une droite dont l'extrapolation à l'origine permet de déduire Io, et la pente, Rg.

- Io est l'intensité à l'origine;

- Rg est le rayon de giration. Il représente la répartition de la masse dans la particule. Il peut aussi se définir comme la somme des densités de diffusion de la particule :

$$Rg^{2} = \frac{\int \rho(r) r^{2} dr}{\int f(r)}$$

Cette représentation de l'intensité par l'équation (4) n'est valable qu'aux très petits angles. Son domaine de validité dépend de la forme de la particule, mais d'une façon générale elle est utilisable jusqu'à des valeurs de q de l'ordre de  $\frac{1}{Rg}$ . Pour une sphère homogène de rayon R on a:  $Rg = \sqrt{\frac{3}{5}}R$ 

Si la sphère n'est pas homogène Rg dépend du solvant.

Io peut être mis en valeur absolue, c'est à dire représenter l'intensité diffusée par une particule dans une solution traversée par un neutron, par cm<sup>2</sup> et par seconde. Io dépend du nombre et de la nature des noyaux de la particule, mais pas de leur arrangement spatial. Pour N particules identiques en solution on a:

(5) Io = N x  $(\xi b - \rho_s V)^2$  x A

- A représente les paramètres de l'expérience

- V est le volume de la particule

- ρ<sub>s</sub> la densité diffusante du solvant

- Éb la somme des longueurs diffusantes de tous les atomes. b a été calculée pour chaque acide aminé et chaque base nucléique. Si la composition de la molécule est connue  $\pounds - \rho_s \gamma$ peut être calculé, sinon il est possible d'utiliser une valeur moyenne pour les protéines et les acides nucléiques (Jacrot et Zaccaï, 1981; Cuillel, 1981).

Pour une particule chimiquement homogène (protéine, DNA ou RNA) 2b et V sont proportionnels à la masse moléculaire M. Io est donc proportionnel à M:

$$\frac{Io}{C} \propto M$$

C étant la concentration de l'échantillon: c'est la seule inconnue qui demeure.

Cette mesure est valable pour des solutions diluées. Il est parfois nécessaire d'extrapoler à concentration nulle.

Pour un mélange (protéine et DNA, par exemple) l'équation (5) devient:

Io = N x  $\left[ ( \angle b - \rho_s V) \text{protéine} + ( \angle b - \rho_s V) DNA \right]^2 x A$ 

Ce calcul de M sera employé pour les protéines dans l'article 1 et pour le virus dans l'article 4 »  b. Détermination d'un rayon. Utilisation des autres maxima de la courbe.

Rg<sup>2</sup> en fonction du contraste <sup>1</sup>/<sub>p</sub> (courbe de Stuhrman) permet de déduire le Rg à "contraste infini". Si l'échange de protons est uniforme dans la molécule, il est possible d'obtenir le rayon extérieur R pour une sphère:

$$R_{ext} = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g \sim$$

Si l'échange n'est pas uniforme, ce qui est le cas d'un virus, il y a erreur par surestimation (Witz, 1983; Zaccaï et Jacrot, 1983).

Le rayon d'une particule homogène peut également être donné par:

 $\Delta q \sim \frac{\pi}{R}$ 

 $\Delta q$  est la distance entre 2 maxima successifs. Plus le virus sera gros, plus les maxima seront rapprochés. En première analyse , le changement de taille d'une particule peut donc être observé par comparaison des écarts de maxima. De même,pour des composés dans lesquels l'acide nucléique se trouve à l'intérieur d'une coque protéique, le rayon extérieur du RNA ou DNA peut être obtenu par la mesure de  $\Delta q$ au point d'extinction de la protéine (en général 40-45% D<sub>2</sub>0).

Pour obtenir plus de détails sur la structure du virus il faut avoir recours à des traitements de données plus complets.

c. Transformée de Fourier inverse et ajustement d'un modèle

L'équation (2) montre que F(q) peut être calculé à partir des valeurs mesurées de I(q):

$$F_{(q)} = \pm \sqrt{I_{(q)}}$$

et par transformée de Fourier inverse on obtient la densité radiale de diffusion  $\rho_{(r)}$  (équation 3). Si la concentration de l'échantillon est connue, I est obtenu en valeur absolue donc , $\rho_{(r)}$  à chaque contraste est calculé sur une écholle

nous

absolue donnant la quantité de protéines, acides nucléiques, lipides et eau à chaque rayon. Cette méthode a l'avantage de ne pas utiliser de connaissances à priori de l'organisation du virus, mais est limitée par la validité de l'approximation sphérique à des résolutions > 50 Å.

Une approche qui élimine les limites de la transformée Fourier consiste à ajuster un modèle aux de données observées. Le modèle se décompose en couches sphériques qui donnent une vue simplifiée de la composition du virus. Chaque couche est définie par un rayon extérieur , un rayon intérieur et par sa densité de diffusion • Le principe consiste à comparer l'intensité calculée à partir du modèle à l'intensité observée expérimentalement. Les densités et rayons sont ajustés progressivement à partir d'un modèle simplifié construit en utilisant les données de la distribution radiale. Plusieurs programmes ont été écrits pour réaliser cet ajustement (D.Schneider et M. Zulauf. non publié; Chauvin, 1978; Cusack, 1981). Les paramètres dus à l'instrumentation étant fixés, les autres paramètres (Io, les rayons des couches, et les densités) varient successivement jusqu'à concordance des courbes calculées et expérimentales.

Il s'agit maintenant d'interpréter, en termes de composition chimique, la distribution radiale ainsi obtenue et sa variation avec le contraste. Cela revient en fait à calculer le volume occupé par chaque constituant (protéine, acide nucléique, eau etc.) dans chaque couche du modèle.

Si un virus possède deux composants: DNA + protéine, pour chaque couche du modèle, le pouvoir diffusant  $\rho_1$  à un contraste 1 est égal à la somme des pouvoirs diffusants de chaque composant occupant un volume donné. Pour la même couche, mais pour un contraste 2, le pouvoir diffusant  $\rho_2$ sera toujours égal à la somme des pouvoirs diffusants de chaque composé occupant le même volume:

contraste 1: $\rho_1 = \rho_1 \text{protéine x } V_1 + \rho_1 \text{DNA x } V_2$ contraste 2: $\rho_2 = \rho_2 \text{protéine x } V_1 + \rho_2 \text{DNA x } V_2$ etc.  $\rho_1 \text{ et } \rho_2 \text{ sont des données expérimentales}$  $\rho_1, \rho_2 \text{ protéines, } \rho_1, \rho_2 \text{DNA sont calculées, comme}$  l'avons déjà vu, à partir de la composition en acides aminés et en bases nucléiques(voir page 27, b).

A partir de ces équations les volumes du DNA et des protéines sont calculés dans chaque couche.

Le modèle est évidemment comparé aux données biochimiques connues (un modèle pour l'adénovirus est discuté dans l'article 4 ).

# 3. Diffusion de rayons X

Nous avons vu que, pour une étude en variation de contraste, les neutrons sont préférables aux rayons X.

A petits angles, la masse moléculaire et le rayon de giration peuvent aussi être déterminés par les rayons X, mais de très petits angles (domaine compris entre 6 x  $10^{-4}$  et 6 x  $10^{-3}$  Å<sup>-1</sup>) sont plus faciles à obtenir avec les neutrons. Les rayons X sont très bien adaptés à l'étude des protéines et des petits virus (diamètre < 150 Å), mais ne conviennent pas pour les grands virus.

En revanche, si les neutrons sont préférables à petits angles car des quantités faibles sont suffisantes (~ 1mg/ml, 100 à 200  $\mu$ l), pour de gros virus, à plus grands angles, ces quantités doivent être augmentées pour obtenir un signal et l'information est limitée. Avec les rayons X, de grandes concentrations sont requises mais dans de très petits volumes (environ 1 à 10  $\mu$ l) et des précipités sont utilisables. Les mesures sont, dans ce cas, déterminées avec une plus grande précision.

III. DIFFUSION DE NEUTRONS ET DE RAYONS X PAR DES PARTICULES

ALLONGEES

Il est possible de définir un rayon de giration transverse et une masse par unité de longueur pour une particule allongée (Luzzati, 1960). La relation (5) devient:

Iq x q = 
$$\pi (1 - \rho_s \frac{B}{V})^2 \times B \times \mu \times A$$

où: B est la somme des longueurs de diffusion

V est le volume (Å<sup>3</sup>) des particules et L leur longueur  $\mu = \frac{B}{L}$  est la longueur de diffusion par Å. La masse par unité de longueur est mesurée à plus grands angles. Si l'échantillon est monodispersé, les mesures, dans une grande gamme de q, donnent la masse moléculaire et la masse par unité de longueur(ceci à été réalisé pour la fibre de l'adénovirus).

# IV. LA DIFFRACTION

La diffraction est une technique complexe largement utilisée ces dernières années pour résoudre la structure des macromolécules (revue: McPherson, 1982).

Nous donnons, ici, quelques définitions très simplifiées.

### 1. Notion de cristal.

Un cristal est formé par la répétition d'un motif moléculaire ou atomique par translation d'une maille le long d'un réseau tridimensionnel. Le réseau peut être défini comme l'empilement d'une infinité de plans réticulaires.



Soit un rayonnement incident (électrons, rayons X ou neutrons) arrivant sur une famille de plans séparés par une distance d. Pour que l'intensité diffractée soit maximum il faut que les ondes réfléchies soient en phase. Elles le seront si:

2d  $\sin \theta = n \lambda$  (loi de Bragg)

où n est un entier. Les ondes réfléchies font le même angle avec le plan que les ondes incidentes. Leurs amplitudes s'ajoutent.

Les valeurs des angles de Bragg permettent de déterminer les dimensions et la forme de la maille élémentaire d'un cristal. Ceci est possible avec un cristal isolé, mais aussi avec une poudre cristalline. Une étude plus complexe consiste à utiliser les amplitudes des ondes réfléchies par un monocristal pour déterminer la structure atomique du motif.

Le cristal est décrit par son <u>"groupe d'espace"</u>. Celuici dépend de la forme et des dimensions du réseau et des éléments de symétrie existant dans ce réseau (voir figure 8 et tableau 6).

Tout plan réticulaire, ou famille de plans, est défini par rapport à la maille par les indices de Miller h, k, l (figure 9). Pour chaque famille de plans passant par le réseau du cristal, un vecteur peut être tracé. Il est parallèle aux plans et sa longueur est  $\frac{1}{d}$  quand d est la distance entre les plans. Les vecteurs sont projetés sur un réseau appelé réseau réciproque. Chaque point du réseau réciproque est identifié par h, k, l et se trouve ainsi relié à une famille de plans du cristal. On peut dire, en simplifiant, que le réseau réciproque est la transformée de Fourier du cristal. Il y a relation entre les rayons diffractés et les positions auxquelles ils peuvent être observés.



Cubic

Figure 8

Les sept structures fondamentales des réseaux cristallins d'après Stout et Jensen (1968).

Crystal system	Number of independent parameters	Lattice	Minimum symmetry of unit cell	Unit cell edges and angles <sup>§</sup>	Diffraction pattern symmetry*	Space groups <sup>¶</sup>
Triclinic	6	P	None	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma$	Ī	PI
Monoclinic	4	Р	Twofold axis parallel to <b>b</b>	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma = 90^{\circ}$ $\beta \neq 90^{\circ}$	2/m	<i>P</i> 2, <i>P</i> 2 <sub>1</sub> <i>C</i> 2
Orthorhombic	3	P C I F	Three mutually perpendicular twofold axes	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$	mmm	P222, P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> , P222 <sub>1</sub> , P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 C222, C222 <sub>1</sub> [ <i>1</i> 222, <i>1</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> ] F222
Tetragonal	2	. Р 1	Fourfold axis parallel to c	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$	4/m 4/mmm	P4, (P4 <sub>1</sub> , P4 <sub>3</sub> ), P4 <sub>2</sub> I4, I4 <sub>1</sub> P422, (P4 <sub>1</sub> 22, P4 <sub>3</sub> 22), P4 <sub>2</sub> 22, P42 <sub>1</sub> 2, (P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2, P4 <sub>3</sub> 2 <sub>1</sub> 2), P4 <sub>2</sub> 2 <sub>1</sub> 2 I422, I4 <sub>1</sub> 22
Trigonal/ rhombohedral	2	R <sup>\$\$</sup> P <sup>\$\$</sup>	Threefold axis parallel to c	a = b = c $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^{\circ}$	3 3m	R3 P3, (P3 <sub>1</sub> , P3 <sub>2</sub> ) R32 [P321, P312], [(P3 <sub>1</sub> 21, P3 <sub>2</sub> 21), (P3 <sub>1</sub> 12, P3 <sub>2</sub> 12)]
Hexagonal	2	Р	Sixfold axis parallel to c	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^{\circ}$ $\gamma = 120^{\circ}$	6/m 6/mmm	P6, (P6 <sub>1</sub> , P6 <sub>5</sub> ), P6 <sub>3</sub> , (P6 <sub>2</sub> , P6 <sub>4</sub> ) P622, (P6 <sub>1</sub> 22, P6 <sub>5</sub> 22), P6 <sub>3</sub> 22, (P6 <sub>2</sub> 22, P6 <sub>4</sub> 22)
Cubic	1	P I F	Threefold axes along cube diagonals	a = b = c $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$	m3 m3m	P23, P2 <sub>1</sub> 3 [ <i>1</i> 23, <i>1</i> 2 <sub>1</sub> 3] F23 P432, (P4 <sub>1</sub> 32, P4 <sub>3</sub> 32), P4 <sub>2</sub> 22 <i>1</i> 432, <i>1</i> 4 <sub>1</sub> 43 F432, F4 <sub>1</sub> 32

TABLEAU 6

Les 65 groupes d'espace permis pour des molécules ne présentant ni mirroir ni symétrie d'inversion (molécules biologiques).



## Figure 9

Les familles de plans qui coupent les côtés (a, b, c) de la maille sont identifiées par des nombres entiers appelés <u>indices de Miller</u> (h, k, l).

Si un plan coupe un axe (x,y,z)à  $\frac{a}{h}$ ,  $\frac{b}{k}$ ,  $\frac{c}{l}$  les indices de Miller sont h ,k ,l .

2. La diffraction de rayons X: conditions expérimentales.

a. Méthode du cristal tournant: monocristal.

Pour obtenir un diagramme de diffraction, qui sera ensuite utilisé pour résoudre la structure, il faut orienter le cristal de façon à l'observer sous un angle qui satisfasse la loi de Bragg. L'information peut être recueillie sur un film photographique. Quand le plan considéré fait un angle avec le faisceau incident, une tache de diffraction est produite sur le film.

b. Méthode des poudres

Une poudre de petits cristaux sans orientations particulières donne un diagramme de diffraction qui n'est plus fait d'une série de taches, mais d'anneaux autour de l'origine. Les informations sont considérablement réduites, mais les dimensions et la forme de la maille peuvent néanmoins être déterminées à partir de la mesure des diamètres des anneaux et de leur indexation. Cette méthode sera utilisée dans le cas de monocristaux de fibre.

3. La diffraction en microscopie électronique

L'image d'un objet est observée directement en microscopie électronique. Généralement, pour voir cet objet, il faut le colorer c'est à dire augmenter le contraste avec le support (Hall, 1955; Brenner et Horne, 1959). La coloration la plus utilisée est la coloration négative par un sel de métal lourd opaque aux électrons (acétate d'uranyl, phosphotungstate de sodium etc.). Le colorant se dépose autour des particules et pénètre dans les parties creuses révélant ainsi les détails de structure de la surface.

En fait l'image observée est formée en deux étapes:

- 1. L'objet donne un diagramme de diffraction au foyer de la lentille (transformée de Fourier);
- 2. Le diagramme de diffraction redonne l'image de l'objet (transformée de Fourier inverse).



De fins microcristaux peuvent être observés en microscopie électronique. L'image finale (micrographie) est souvent pauvre en information structurale à cause du bruit de fond dû à la taille du colorant, au support et au matériel inorganisé éventuellement présent dans la préparation. Le diagramme de diffraction, au contraire, est très net car il représente une moyenne de plusieurs motifs. Il peut être obtenu directement au plan focal du microscope, mais il est généralement plus commode d'utiliser un banc optique (Laser) pour obtenir ces diagrammes sur un grand nombre de micrographies. Cette façon de procéder permet de sélectionner les meilleures micrographies et les régions les plus ordonnées de l'image du cristal, ainsi que de contrôler le réglage du microscope (détection de l'astigmatisme et mesure la défocalisation: contrôles importants à réaliser de avant de mesurer les intensités et de faire un traitement d'image).

micrographies sélectionnées Les sont micro densitométrées. Les diagrammes de diffraction sont alors calculés directement par l'intermédiaire d'un programme d'ordinateur et les intensités sont mesurées très structure peut alors être calculée par précisement. La synthèse de Fourier. Les taches de diffraction représentent ce qui vient de la matière biologique. Il est donc possible, à ce niveau, de construire un filtre qui élimine le bruit de fond avant de reconstituer l'image initiale. L'image filtrée est une projection de la densité électronique dans un plan perpendiculaire au faisceau d'électrons.

Pour obtenir une information tridimensionnelle, le procédé est répété en faisant varier l'orientation de l'échantillon ("tilt"). La structure est alors reconstituée à partir d'une série de projections bidimensionnelles (Unwin et Henderson, 1975).

La résolution obtenue est limitée à la taille des grains du colorant ( $\sim 20\text{\AA}-30\text{\AA}$ ). De plus, les échantillons biologiques sont très sensibles à l'irradiation par les électrons, et des expositions prolongées peuvent provoquer des distorsions dans la structure.Un moyen d'augmenter la résolution est d'observer l'échantillon sans colorant, mais il est alors plus sensible à la destruction. Il faut dans ce cas travailler à faible dose d'électrons et/ou utiliser des techniques de congélation de l'échantillon.

## INTRODUCTION

Dans un premier temps, avant d'aborder la structure du virus, j'ai entrepris la détermination du poids moléculaire (PM) des protéines natives de la capside par diffusion de neutrons. Sept protéines semblent intervenir dans l'architecture de la capside. Le poids moléculaire de leurs chaînes polypeptidiques est bien caractérisé par gel de polyacrylamide-SDS (tableau 7), mais seule la structure oligomérique de l'hexon (trimère) est connue sans ambiguité. Elle a été confirmée par les études cristallographiques (Franklin et al., 1971). La base du penton située à un sommet d'ordre 5 est souvent considérée comme un pentamère.

Les protéines hexon et penton (base du penton + fibre) sont considérées comme les protéines majoritaires de la capside et sont les plus étudiées. Elles présentent l'avantage d'être obtenues en grande quantité dans les surnageants de lysats cellulaires lors de la purification du virus. Au début de ce travail, les poids moléculaires de la fibre, de la base du penton et du penton natifs, avaient été essentiellement obtenus par centrifugation à l'équilibre et filtration sur gel. Les valeurs publiées sont présentées dans le tableau 8.

Les données de la diffusion de neutrons nous ont apporté de surprenants résultats quant à la stoechiométrie de la base du penton et de la fibre. Les poids moléculaires trouvés pour la base du penton, le penton complet et la fibre, ne sont compatibles qu'avec une base du penton trimérique. Le PM trouvé pour la fibre est, quant à lui, intermédiaire entre celui d'un dimère et celui d'un trimère.

A partir de ces résultats, les poids moléculaires et la stoechiométrie de ces deux protéines (la base du penton et la fibre) ont été réexaminés.

Les études suivantes ont été réalisées:

- détermination ou redétermination des paramètres
- hydrodynamiques des protéines par ultracentrifugation analytique, diffusion de lumière et densitométrie;
- comparaison des résultats obtenus par gels en milieu dissociant et non dissociant;

Polypeptide	Poids moléo	oulaire
	(a)	(b)
II (hexon)	120000	108113
III (base du penton)	85000	
IIIa associé aux hexons	66000	
peripentonaux		
IV (fibre)	62000	62200
V protéine du nucléoide	48500	
VI associée au II	24000	
VII protéine du nucléoide	18500	19258
VIII associé au II	13000	
IX associé au II	12000	14500
X produits de		
XI dégradation des	4000-6000	
XII précurseurs		

### TABLEAU 7

Poids moléculaire des polypeptides de l'adénovirus de type 2.

- a. déterminé d'après l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS (Anderson et al., 1973).
- b. calculé d'après la séquence (références: généralités I, paragraphe I<sub>2</sub>.

		Technique				
Protéine		Cristallographie	Séquence	Centrifugation à l'équilibre	5 Filtration sur gel	
Hexon		330-356000 <sup>1</sup>	3x108000	355-362000 <sup>4</sup>	418000	
Base du Penton	Type Sauvage		-		256000	
	Mutant		-		286000	
Penton			<u> </u>	4000003	664000	
Fibre			<b></b>	192-207000 <sup>2</sup>	180000	

### Tableau 8

Poids moléculaires des protéines natives de l'adénovirus de type 2.

- 1. Franklin et al. 1971.
- 2. Sundquist et al.1973b.
- 3. Pettersson et Höglund ,1969.
- 4. Pettersson et al.1967.
- 5. Lemay et Boulanger ,1980.

- caractérisation par rayons X et microscopie électronique de petits cristaux de fibre (résultat préliminaire d'une étude à plus haute résolution de la fibre).

# I. DIFFUSION DE NEUTRONS

Aux petits angles, l'intensité à l'origine Io est proportionnelle à la masse moléculaire M (voir Généralités II, paragraphe  $II_2$ ).

$$\frac{I_o}{c} \propto M$$

Le point important de cette détermination de M est la connaissance précise de la concentration c de l'échantillon, tous les autres paramètres pouvant être mesurés lors de l'expérience ou calculés.

# 1. Mesure de la concentration

La méthode la plus classique pour déterminer la concentration d'une solution de protéines est de réaliser un dosage colorimétrique. Le plus courant est celui de Lowry. La détermination de la concentration se fait par comparaison avec une protéine connue, le plus souvent la sérum albumine bovine (BSA). Or, cette technique, si elle est une bonne approximation de la concentration relative, n'est pas une bonne détermination absolue. Plusieurs critiques peuvent lui être adressées:

- elle donne une concentration relative à la BSA. Il faut donc admettre que toutes les protéines ont le même comportement vis à vis du colorant;
- le dosage fait intervenir les liaisons peptidiques des protéines, mais aussi les groupements phénoliques de certains acides aminés. Il dépend donc de la composition;
- le dosage est sensible à certains composés présents dans les tampons (revue par Bensadoun et Weinstein, 1976).

Un autre colorant utilisé est le bleu de Coomassie (technique de Bradford, 1976). Le dosage n'est pas sensible à la nature du tampon (Spector, 1978), mais varie beaucoup en fonction de la composition de la protéine (Pierce et Suelter, 1977).

semblait donc préférable d'utiliser une 11 autre approche pour mesurer la concentration. Elle a consisté à mesurer la composition en acide aminés de la solution de protéines en présence d'une référence de concentration connue: la norleucine. Un aliquot de protéine, de volume connu et dont l'absorbance (D.O. densité optique) est mesurée, est hydrolysé 12, 24, 48 heures en présence d'une quantité connue de norleucine. Les acides aminés sont analysés quantitativement. Si les résultats sont corrigés pour le contenu en tryptophane et en cystéine, généralement détruits lors de l'hydrolyse, la concentration obtenue est plus fiable que celle mesurée par les dosages de protéines. dont la séquence, le coefficient d'extinction L'hexon moléculaire et la masse moléculaire sont connus, constitue un bon témoin. Lorsqu'un certain nombre d'analyses quantitatives a été réalisé, la meilleure stratégie consiste à calculer le coefficient d'extinction moléculaire & d'après la loi de Beer-Lambert, pour chaque protéine et à une longueur d'onde donnée $(\lambda)$ .

#### $D_{\bullet}O_{\bullet} = \mathcal{E}cl$

c étant la concentration en mg/ml;

1 la longueur de la cuve de mesure en cm;\*

D.O. la densité optique pour les protéines mesurée à

278 nm.

Il sera ainsi plus facile par la suite de déduire la concentration de la mesure de l'absorbance (tableau 9).

2. Mesures de diffusion de neutrons.

Les mesures de diffusion de neutrons se font avec des solutions protéiques de 2 à 5 mg/ml. Les courbes Ln I(q) en

	a 1%		Rg(	·(X)	
Capsid protein	278	MW	neutron	X-ray	
Hexon	1,450	350000	43±0,8	43	
Penton base	1,145	246000	46±2	ND	
Penton	1,030	362000	94±6	92	
Fibre	0,850	156000	75±11	75	
Fibre II	0,850	298000	155 ± 5	ND	
		мw/ 8			
Fibre II	n	530	8,9		

### TABLEAU 9

Poids moléculaires (MW) déterminés d'après les mesures de diffusion de neutrons.

les coefficients d'extinction moléculaires sont déduits des analyses d'acides aminés (voir texte). Fibre II est une préparation contenant des dimères de fibre I. Le PM par unité de longueur et le rayon de giration transverse sont déterminés pour des valeurs de q<1.14 x 10<sup>-1</sup>Å

Capsid protein	v	s x 10 <sup>13</sup>	Dx10 <sup>7</sup>	M W	Stokes radius (Å)
Hexon	0 <sub>,</sub> 725	13	3,72	310 000	57
Penton	0, 730	10,55	2,60	365000	92
Fibre	0, 703	6,09	3,10	161000	68

#### TABLEAU 10

Poids moléculaires (MW) déterminés d'après les paramètres hydrodynamiques  $\bar{v}$ , S et D.

fonction de q<sup>2</sup> donnent le rayon de giration Rg et l'intensité à l'origine Io dont on déduit M (tableau 9).

La courbe I x q en fonction de q<sup>2</sup> (q < 1,14 x  $10^{-1}$ Å) permet de calculer M par unité de longueur pour la fibre (530/Å).

II. DETERMINATION DES PARAMETRES HYDRODYNAMIQUES

M peut être calculée à partir de la relation de Svedberg:

$$M = \frac{S}{D} \times \frac{KT}{(1 - \overline{U}\rho)}$$

où: R est la constante des gaz parfaits

- T est la température absolue
- S est le coefficient de sédimentation. Il est mesuré par ultracentrifugation analytique à 49500 rpm et corrigé pour les conditions standards S<sub>20,w</sub> (20°C, eau). Dans le cas de la fibre, le coefficient de sédimentation dépend de la concentration c et doit être extrapolé à concentration nulle. Il est indépendant de c pour l'hexon et le penton.
- D est le coefficient de diffusion. Il a été mesuré par diffusion de lumière et corrigé pour les conditions standards D<sub>20,w</sub>. Il est indifférent à la concentration pour les trois protéines.

Fibre	Ultracentrifugation	Diffusion	de lumière
Concentration	s <sub>20,w</sub> x 10 <sup>13</sup>	D <sub>20,w</sub> x10 <sup>7</sup>	Rayon de
mg/ml		ng na mina da guna dan 2 mina diga pangan ang ang ang ang ang ang ang ang an	Stokes
0.283	5*9	3•15	67+4
0*885	5•7	3•15	67•8
2.024	5.4		1.509
5 • 794	4.09	3.11	68.0

v est le volume spécifique partiel. Il est souvent calculé à partir de la composition en acides aminés de la protéine. à mais cela peut conduire des valeurs erronées. principalement dans le cas de composés multimériques et/ou de forme très allongée comme la fibre.Le v mesure le changement de volume d'une solution par l'apport d'une unité de masse de soluté (ici de protéines). Or les propriétés d'hydratation autour de la molécule peuvent affecter v. En effet. l'hydratation d'une molécule protéique dépend de la nature des acides aminés exposés à sa surface et éventuellement de la présence d'autres composés( sucres par exemple). De plus. la fibre étant une molécule très allongée, un plus grand nombre d'acides aminés est en contact avec le solvant. Il a été montré expérimentalement que la composition du solvant, son pH et la température affectent  $\overline{v}$  (Durchschlag etJaenicke, 1982). Il était donc préférable de mesurer les densités des solutions de protéines natives étudiées (d) et de leur tampon (ds) à l'aide d'un densimètre et d'en déduire le v.

$$\bar{v} = \frac{1}{ds} \left[ 1 - \frac{1}{c} \left( d - ds \right) \right]$$

c est la concentration en g/ml. Les résultats sont regroupés dans le tableau 10.

III. INTERPRETATION QUANTITATIVE DES ELECTROPHORESES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE-SDS

Les polypeptides de l'adénovirus sont bien séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 17.5% en milieu dissociant (SDS). Il est donc possible de déduire leur stoechiométrie, c'est à dire le nombre de copies de cnaque polypeptide présent dans le virus, à partir de la masse protéique de chaque bande de gel. La quantité de masse protéique correspondant à chaque chaîne polypeptidique peut être connue, soit en mesurant la quantité de colorant lié à la protéine dans chaque bande, soit en mesurant la radioactivité lorsque les protéines sont marquées.

Le gel est coloré avec le bleu de Coomassie (SERVA) qui absorbe dans le visible à 590 nm. Il suffit donc de "balaver" le gel avec un faisceau lumineux de longueur d'onde 590 nm à l'aide d'un densitomètre enregistreur de gel. Un spectre d'absorption du colorant en fonction de la migration est obtenu. Chaque pic correspond à un polypeptide et il est possible de faire l'approximation que la surface du pic est proportionnelle à la masse protéigue colorée. La composition du polypeptide hexon est bien connue dans le virus, soit 3 x 240 = 720 chaînes polypeptidiques de masse moléculaire 108000 (d'après la séquence). La surface du pic hexon correspond donc à une masse protéique de 77.8 x 10<sup>6</sup> pour un virus. ce qui permet d'estimer les autres surfaces en terme de masse moléculaire. Or, nous allons voir qu'il existe des limites à cette méthode:

- a. la protéine hexon est la plus représentée dans le virus.
  Quand les quantités de virus dissociés déposées sur gel sont suffisantes pour que les pics de III et de IV soient visibles et mesurables sur le spectre d'enregistrement, le pic d'hexon devient soit ininterprétable, soit sous-estimé par saturation au niveau de l'enregistreur (courbe 10). Pour éliminer cette cause d'erreur, des quantités croissantes de virus dissociés sont déposées sur gel et la mesure des surfaces de pics se fait dans les parties linéaires des courbes;
- b. la réponse au bleu de Coomassie varie largement d'une protéine à l'autre (Pierce et Suelter, 1977). Le dosage par la technique de Bradford (1976) de solutions de sept protéines différentes, purifiées et dénaturées en SDS, a été effectué à 595 nm. Les spectres d'absorption en fonction de leur concentration sont montrés par la figure 11. La concentration est déterminée à partir de la densité optique à 278 ou 280 nm et du coefficient d'extinction moléculaire . Pour pouvoir comparer les résultats des gels, nous avons calculé un facteur de correction de coloration pour chaque protéine, par rapport à l'hexon.



Figure 10

Variation de l'intensité de coloration des protéines (hexon, base de penton et fibre) en fonction de la quantité (en  $\mu$  g) de virus dissocié deposé sur gel.

- la concentration en protéines de chaque dépôt est calculée à partir de l'absorbance à 278 nm.

- l'intensité de coloration de chaque bande protéique est déterminée par la mesure de la surface du pic correspondant, après enregistrement du gel.

80) ULL



Figure 11

Dosage par le Bleu de Coomassie (Bradford, 1976) de sept protéines dénaturées par 0.1% de SDS. La concentration des protéines est déduite de la mesure de l'absorbance à 278 ou 280 nm ( $\pounds$  étant connu par ailleurs).

Pour une même prise d'essai, la D.O. à 595 nm varie d'une protéine à l'autre. Un facteur de correction est calculé par rapport à l'hexon.

Capsid protein	Protein mass per virion x 10 <sup>-6</sup>	Protein mass per apex x 10 <sup>-6</sup>	MW of polypeptide subunit x10 <sup>-3</sup>	Number of copies per apex
Hexon	77.8	0	. 108	0
Penton base	3.1	277	85	3.0
llta	7.3	658	66	9.2
Fibre	1.6	140	62	2.2

TABLEAU 11

Poids moléculaires et stoechiométrie des protéines de l'apex déterminés d'après les gels de polyacrylamide-SDS colorés (voir article 1).

Entité	Virale	Marquage	Rapport III	Rappo	rt théoriqu	16
		<sup>35</sup> S-Met	1.51	  V	nombre s	de chaines 3
Pento	n soluble	<sup>14</sup> C-aa	1.25		•	
		coloration	1.80	3	2.28	1,37
<b>6</b>		<sup>14</sup> C-Val	1.68	2		2.05
Virion	n	coloration	1,95			
		Т	ABLEAU 12			

Stoechiométrie de la base du penton et de la fibre dans la particule virale et dans le penton, colorés ou radioactifs. (à droite, rapport théorique dans le cas où la base du penton est un pentamère ou un trimère et la fibre un trimère ou un dimère).

-----

Le tableau 11 montre la masse moléculaire de III et IV et leur stoechiométrie par apex. Le dosage par le bleu de Coomassie n'a pas pu être effectué sur le IIIa (par manque de matériel). Le résultat présenté pour cette protéine est donc incertain.

Le tableau 12 compare les rapports base du penton sur fibre, mesurés d'après les gels colorés et radioactifs (voir article 1), et les rapports théoriques, en supposant que la base du penton est soit un pentamère, soit un trimère, et la fibre un trimère ou un dimère.

IV ESTIMATION DU POIDS MOLECULAIRE DES PROTEINES NATIVES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU NON DISSOCIANT

gel de polyacrylamide, les molécules vont migrer Sur électrophorétiquement en fonction de leur masse moléculaire et charge ionique. En milieu dissociant (SDS) de leur l'apport d'un excès de charges négatives dû au SDS annule la contribution des charges dues aux molécules, et celles-ci migrent uniquement en fonction de leur masse moléculaire. Si plusieurs protéines de masse moléculaire connue sont soumises à une électrophorèse en même temps que les protéines inconnues, il est possible de déterminer par comparaison la masse moléculaire apparente des sous-unités polypeptidiques. Le logarithme de M est proportionnel à la migration et une droite de référence peut être tracée.

Au contraire, en gel non dissociant, la charge nette des natives est loin d'être négligeable et une telle protéines détermination est impossible. Par exemple, la figure 2 de l'article 2 montre que la fibre, dont le poids moléculaire doit être 124000 ou 186000, migre comme une protéine d'environ 400000. Pour tenter de supprimer cet inconvénient, nous avons bloqué les charges positives des molécules par la fluorescamine et nous avons utilisé des systèmes de gel de polyacrylamide en gradient de concentration et à pH alcalin (pH Des protéines oligomériques de haut 9.4). poids
moléculaire connu servent de référence. Elles sont bloquées par la fluorescamine, de même que les protéines inconnues. Entre 700000 (Thyroglobuline) et 90000 (phosphorylase B) le fonction de la migration est une droite. Ln M en Les protéines témoins vendues dans le commerce sont des protéines être assimilées à des protéines globulaires. Or, pouvant la une molécule allongée. **I**1 fibre est semblait donc indispensable de comparer sa migration à celles de protéines fibreuses. Malheureusement, à l'état natif, ces protéines se solubilisent mal dans le tampon d'électrophorèse et ne pénètrent pas dans le gel (c'est le cas du collagène et de la Le seul résultat utilisable fut myosine). celui du boeuf. La droite de référence fibrinogène de permet de déterminer un poids moléculaire de 390000 pour le fibrinogène bloqué par la fluorescamine, et de 160000 pour la fibrefluorescamine.

وبوا والمتحد والمراجع

Les tables du "Handbook of Biochemistry" (2nd edition, press) indiquent, pour le fibrinogène de boeuf, un poids CRC moléculaire de 390000 (référence Enge et al., 1958). Or, le fibrinogène est constitué de trois paires de chaînes Ax, BB et  $\chi$ , de PM en gel: A $\propto$  = 68000, B $\beta$  = 55000 et  $\chi$  = 45000 (pour 340000 pour la le fibrinogène bovin), soit protéine native.Ce chiffre est confirmée par les données de la cristallographie ( 330000; Tooney et Cohen, 1977). Il semble donc difficile de comparer avec précision la migration des protéines fibreuses et celle des protéines globulaires, de même que de conclure à un comportement identique pour la fibre et le fibrinogène dans ce système de gel.

V. ARRANGEMENT DES MOLECULES DE FIBRES DANS LE CRISTAL ET STOECHIOMETRIE

1. Cristallisation

La fibre de l'adénovirus de type 5 a été cristallisée par Mautner et Pereira (1971) par changement de pH de 6,8 à 6,0. Les cristaux obtenus étaient trop petits pour une étude cristallographique aux rayons X, mais des cristaux biavaient été observés dimensionnels en microscopie électronique. Cette méthode n'a pu être appliquée avec succès la fibre de l'adénovirus de type 2 (observation pour personnelle, confirmée par Green et al., 1983). Nous avons alors mis au point une méthode de cristallisation pour la fibre de type 2 qui a permis d'obtenir des petits cristaux (200-400  $\mu$  m) utilisables pour faire un diagramme de poudres aux rayons X et pour observer en microscopie électronique.

La fibre purifiée (en solution dans un tampon phosphate de Na, 10 mM, pH 6,8) est concentrée par dialyse sous vide à l'aide d'un microconcentrateur Prodicon (Bio-Molecular Dynamics, Beaverton, Oregon), puis dialysée une nuit contre du phosphate de Na, 10 mM, pH 6,0. La cristallisation est alors réalisée par la technique des "gouttes pendantes", en présence de polyéthylène glycol 6000 (PEG) (McPherson, 1976). La technique est décrite à la figure 12. Les cristaux apparaissent en 2 à 3 semaines à température ambiante. Pour des concentrations de fibre de 5 à 8 mg/ml et pour 3 à 5% de PEG, les cristaux obtenus sont de forme trianglulaire de 200-400 µ m de côté, mais seulement de 10-20 µ m d'épaisseur (figure 12). Ils se présentent sous forme d'agrégats de petits cristaux. Il a été possible, récemment, d'obtenir de plus gros cristaux ( 800 µm de côté, figure 17) poussant isolément pour des concentrations particulières de fibre et de PEG (5.34 et 6.23 mg/ml pour 4% de PEG).

L'augmentation progressive du phosphate de sodium (10 à 500 mM) ainsi que l'addition de chlorure de sodium (10 à 500 mM) ont empêché la cristallisation. De même, si les boites de cristallisation sont laissées à +4 °C plutôt qu'à la





# Figure 12

Cristaux de Fibre de l'adénovirus de type 2.

La cristallisation est réalisée dans des boites stériles de cultures de tissus en polystyrène (Linbro, Flow Laboratories) comprenant 24 cupules de 3,5 ml. 1 ml de phosphate de Na, 10 pH 6,0 contenant X% de PEG sont deposés au fond des mΜ cupules. 10 µl du même tampon contenant la même quantité de PEG sont mélangés à 10  $\mu$ l de la solution protéique et déposés une lamelle de microscope (20x20 mm) préalablement sur siliconée (Aquasil 0.2%; Pierce, Rockford Illinois). La lamelle est retournée au dessus de la cupule dont les bords ont été graissés. La cristallisation se fait par diffusion de vapeur entre le tampon de la cupule et la "goutte pendante" en 2 à 3 semaines.

température ambiante, la cristallisation n'a pas lieu. Si les préparations de fibre purifiée à pH 6.8 sont congelées (-20 °C) ou laissées au réfrigérateur (+4 °C, plus d'une semaine), elles ne peuvent pas être utilisées pour la cristallisation.

Les cristaux dissous dans un tampon tris-glycine pH 8.9 et soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS présentent une bande de fibre extrêmement pure.

2. Caractérisation du cristal de fibre: dimensions de la maille et groupe d'espace.

a. Microscopie électronique.

Les cristaux sont trop épais pour une observation directe au microscope électronique, et dans les stades précoces de cristallisation aucun cristal bidimensionnel n'est observé. Pour obtenir des images, les cristaux sont écrasés doucement à l'aide d'un homogénéisateur (Potter) avant de les déposer sur des grilles recouvertes de Formvar et d'un mince film de carbone. Les préparations sont colorées négativement avec une solution d'acétate d'uranyl 1% pH 4.4.

Deux images différentes sont observées. La figure 13 présente la vue la plus fréquemment rencontrée. D'après la forme de la fibre (molécule allongée de 200 x 20 Å terminée par une sphérule de 40 Å de diamètre ) nous avons interprété les quatre bandes blanches (200 Å) comme un empilement de têtes de fibres, les queues étant disposées longitudinalement.

La figure 14a montre de larges zones ordonnées, mais difficilement interprétables. Cette image convient bien à l'application de la technique de filtration d'image. L'image filtrée présente une symétrie hexagonale avec a = 76 Å.

С b 3 4 1 2



Figure 13

a. Image de microscopie électronique (x 280000) montrant une structure de 4 fortes bandes (largeur totale 200 Å) qui se répète tout les 580 Å (encart: x 480000).
b. Diagramme de diffraction optique correspondant à (a).
c et d. Deux modèles possibles de l'arrangement longitudinal des molécules de fibres d'après (a).
(détails: figure 1, article 3).



- b. diagramme de diffraction de (a) obtenu par transformée de Fourier.
- c. Image de (a) reconstituée après filtrage (distance A-B = 76Å).

a

b. Rayons X.

Un capillaire rempli avec une poudre de petits cristaux est soumis à un faisceau de rayons X à une distance échantillon-film de 10 et 100 cm, permettant une gamme de q =  $6 \times 10^{-3}$  à  $2\text{\AA}^{-1}$ . La figure 15 montre les films obtenus et leur indexation. La résolution s'étend jusque 12 Å. Les réflexions peuvent être indexées sur un réseau ayant une maille hexagonalee,où a = b = 77Å,  $\alpha = \beta = 90^{\circ}$  et  $\gamma = 120^{\circ}$ suggérant un groupe d'espace hexagonal ou trigonal. Les résultats de la microscopie électronique confirment ces dimensions (figure 14). Cependant une maille orthorhombique centrée avec b = a $\sqrt{3}$  donne la même série de réflexions.

Des observations précédentes il est possible de déduire plusieurs points déterminants dans le choix de la symétrie:

- les images de microscopie électronique (figure 14b) montrant une projection perpendiculaire à la direction de la fibre suggèrent un axe d'ordre 3 parallèle à cette direction.Le groupe d'espace est donc vraisemblablement trigonal ou hexagonal, puisqu'il n'y a pas d'axe 3 dans un groupe d'espace orthorhombique;
- la figure 13 montre la présence d'un axe d'ordre 2 perpendiculaire à la direction de la fibre;
- il n'y a pas d'extinctions systématiques dans la série des réflexions 001 (qui correspond à l'axe d'ordre 3 ou 6),ce qui élimine un axe hélicoïdal.

Les groupes d'espace possibles sont donc: P312, P32i ou P622, en tenant compte du fait qu'une molécule biologique ne peut pas avoir un groupe d'espace qui comprend un centre d'inversion.

# 3. Modèle d'assemblage des fibres dans le cristal.

Pour expliquer les 4 rangées de têtes de fibres, il faut qu'il y ait au moins 2 molécules de fibres dans l'unité asymétrique. Le groupe d'espace P622 doit être éliminé car il implique la présence d'un plus grand nombre de fibres que ne peut en contenir la maille. Nous avons choisi de construire le modèle avec P321 car l'espace est mieux rempli, mais P312 aurait aussi pu être utilisé. Le modèle est proposé à la figure 16.

4. Densité du cristal et stoechiométrie de la fibre.

La détermination de la densité d'un cristal est souvent délicate, aussi plusieurs techniques ont-elles été comparées.

a. Gradient de Ficoll.

Le Ficoll 400 (Pharmacia) est constitué de polysaccharides de hauts poids moléculaires (~400000) et ses molécules ne peuvent pas diffuser dans le cristal (Westbrook, 1976). Des gradients de 40-60% sont préalablement formés (5 ml), le cristal est déposé au sommet et les gradients sont centrifugés 24 h à 10000 rpm. Une période supplémentaire de 24 h de centrifugation permet de contrôler que le cristal n'a pas bougé. Les densités sont mesurées par pesées, la densité le long d'un gradient variant de 1.17 à 1.25.

b. Mélanges organiques.

Les techniques classiques de détermination des densités de cristaux consistent à les faire flotter dans des mélanges organiques (Low et Richards, 1952). Des mélanges de xylène (d = 0.860) et de tétrachlorure de carbone (d = 1.594) permettent de réaliser des gradients de 1.00 à 1.30. Les densités sont mesurées à l'aide de gouttes de chlorure de césium de densité connue (déterminée par l'indice de réfraction). Le cristal doit être préalablement séché à l'aide d'une microseringue. Pour cette expérience un des cristaux a été fixé au glutaraldehyde 0.25%.











Cristaux de fibre: diagrammes de poudre obtenus par diffraction de rayons X. La distance entre l'échantillon et le film est de : (a) 10 cm et (b) 100 cm;

des

(c) et (d) présentent les courbes d'enregistrement films.

(détails: figure 3. article 3).



Figure 16

Modèle tridimensionnel expliquant l'arrangement des molécules de fibre dans la maille hexagonale.

BUS

Les plans 1 à 4 correspondent aux 4 fortes bandes observées sur la micrographie de la figure 14a. l'arrangement des "têtes" de fibres (supposées sphériques avec un diamètre de 38 Å)est montré en: A: pour le plan 2, B: pour les plans 1 et 4, C: pour le plan 3. Les autres possibilités sont discutées dans l'article 3. c. Gradients de Percoll.

Le Percoll (Pharmacia) est une suspension de billes de silice recouvertes de polyvinylpyrolidone qui permet de réaliser des gradients de densité. La solution de Percoll à 80% est ajustée à pH 6.0 pour cette expérience, et centrifugée 40 mn à 20000 rpm. Les densités sont mesurées par pesées ou à l'aide de billes de couleur vendues par le fabricant. Le cristal est déposé sur le gradient préformé. Une gamme de 1.030 à 1.190 peut être réalisée.

# d. Résultats.

Les résultats suivants ont été obtenus:

Technique	Densité	
	sans fixation	avec fixation
Ficoll 400	1,221	-
Xylène/Tétrachlorure de C	1.245	1.227
Percoll	1.110	1.120

Les densités obtenues par gradients de Ficoll et mélange xylène/tétrachlorure de Carbone sont en accord. Celle trouvée par gradient de Percoll est beaucoup plus faible. Pertoft et al. (1979) ont montré que les densités des particules biologiques isolées en gradient de Percoll étaient toujours plus faibles que dans les autres milieux. Nous avons donc éliminé cette mesure. Des cristaux de densité connue, lysozyme (d = 1.245) et  $\prec$  amylase (d = 1.187), ont permis de vérifier la cohérence des résultats. e. Stoechiométrie de la fibre.

$$dc = \frac{M_p + M_H 0}{V_c}$$

dc est la densité du cristal.

 $M_p$  est la masse protéique. Elle est calculée a partir du PM de la chaîne polypeptidique de la fibre (62200 d'après la séquence).  $M_p = n \ge 62200 \ge 1.66 \ge 10^{-24}$ . n est le nombre de chaînes polypeptidiques dans la maille du cristal;

 $M_{H_20} = (V_c - V_p) \times d_{H_20}$ , est la masse de l'eau contenue

dans le cristal ;

 $V_c$  est le volume du cristal calculé d'après les dimensions de la maille (3.03 x 10<sup>6</sup> Å<sup>3</sup>).  $V_p$  est le volume de la protéine =  $M_p$  x  $\tilde{v}$  . Le volume spécifique est déterminé par densitométrie (0.703 cm<sup>3</sup>/g, voir tableau 10). Le calcul de n est aussi effectué en utilisant le v déduit par Lemay et Boulanger (1980) d'après la composition en acides aminés (0.729 cm<sup>3</sup>/g).

$$dc = \frac{M_{p} + (V_{c} - M_{p} \times \overline{v})}{V_{c}} = 1 + \frac{W_{p}(1 - \overline{v})}{V_{c}}$$

$$dc = \frac{1 + n \times 62200 \times 1.66 \times 10^{-24}(1 - \overline{v})}{3.03 \times 10^6}$$

d'où il est possible de tirer n en faisant varier la densité du cristal, de 1.221 à 1.245, et le  $\overline{v}$  de 0.703 à 0.729:

22 < n < 26

Le groupe d'espace (P321) et l'arrangement des molécules fibres dans le cristal n'autorisent que 12 molécules de de fibre dans la maille donc, d'après la valeur de n, 24 chaînes polypeptidiques (58% de protéines dans le cristal). La fibre doit donc être un dimère. Cette conclusion dépend évidemment de la détermination correcte du groupe d'espace. Dans le cas d'un groupe d'espace orthorhombique (paragraphe 2b) la conclusion aurait été une fibre trimérique. Bien que les images de microscopie électronique soient en faveur du groupe d'espace choisi, il faudra attendre les données de la cristallographie à haute résolution pour éliminer définitivement l'autre hypothèse.

# VI. CONCLUSION

La diffusion de neutrons et la détermination des paramètres hydrodynamiques, deux méthodes complètement indépendantes, donnent pour le penton complet de l'adénovirus de type 2 un poids moléculaire à l'état natif de 362-365000. Cette valeur est incompatible avec l'hypothèse habituellement admise d'une base du penton pentamérique (PM théorique: 425000) et d'une fibre trimérique (PM théorique: 186000). Le total dans ce cas serait 661000. Par des expériences PM identiques nous avons montré que la base du penton du mutant H<sub>2</sub>ts 125, défectif pour la production de la fibre, possède un de 245000, suggérant un trimère (3 x 85000 = 255000). РМ Le du penton complet semble plutôt compatible avec une base PM penton trimérique et une fibre dimérique (théoriquement du 255000 + 124000 = 379000). Néanmoins la fibre isolée présente, par les mêmes méthodes d'analyses, un PM de 156000-162000, ce qui est intermédiaire entre un trimère (3 x 62000 186000) et un dimère (124000). On ne peut pas remettre = en cause le poids moléculaire de la sous-unité de la fibre puisqu'il est connu avec précision d'après la séquence. 11 est possible que celui du polypeptide de la base du penton soit légèrement différent du PM apparent déterminé par gel, mais la différence existant entre un trimère et un pentamère

(255000 par rapport à 425000) est très grande et ne peut pas être expliquée par une variation du PM de la chaîne polypeptidique.

L'analyse de gels quantitatifs (virion et penton complet) confirme le caractère trimérique de la base du penton. Par sédimentation à l'équilibre. Pettersson et Hoglünd (1969) trouvent, pour le penton complet, des valeurs (370-400000) en accord avec nos résultats. Au contraire, par filtration sur gel (Sephacryl S-200 et S-300; Lemay et Boulanger, 1980), le penton complet apparaît plus lourd (660000), mais la base du penton présente un PM de 256000 et 286000 (H<sub>2</sub>ts 125 et type sauvage respectivement).

Les résultats obtenus pour la fibre isolée sont moins nets. Les valeurs trouvées par diffusion de neutrons (156000, fibre I; 49000-154000, fibre II), par les paramètres hydrodynamiques (162000) et par gels non dénaturants (160000) sont homogènes, mais ne permettent pas de déterminer la stoechiométrie de la fibre. Les résultats obtenus par diffusion de neutrons pour le penton complet (365000 - 245000 120000), ainsi que l'interprétation quantitative de certains gels dénaturants, suggèrent un dimère. Les valeurs précédemment "publiées par Sundquist et al., 1973b (207000; sédimentation à l'équilibre) et Lemay et Boulanger, 1980 (186000; filtration sur gel) sont en faveur d'un trimère.

C'est l'étude, par diffraction de rayons X et par microscopie électronique, de petits cristaux de fibre qui nous a permis de conclure que la fibre est vraisemblablement un dimère. Le groupe d'espace du cristal (P321), les dimensions de la maille et images de les microscopie électronique réduisent nombre le de possibilités d'arrangement des fibres dans la maille. La détermination de la densité du cristal permet de sélectionner le modèle qui rend compte de l'ensemble des données. Dans ce modèle. la fibre est un dimère. Ceci est en accord avec le modèle Green et al. (1983) prédisant structural de une fibre dimérique à partir de l'étude de la séquence primaire. Les monocristaux obtenus récemment  $(800 \times 20 \ \mu m)$ gros plus présentent un diagramme de diffraction allant jusqu'à 3 Å (figure 17). Une étude à haute résolution continuera donc ce travail.



# 1mm

•

Figure 17

Cristal de fibre (  $800-1000 \mu m$  ) obtenu en 3 semaines pour 5,34 mg/ml de fibre et 4 % de PEG.



Le caractère trimérique de la base du penton. et dimérique de la fibre, semble donc bien établi. Ces résultats posent un important problème de symétrie au niveau des apex du virus. Pour satisfaire la théorie de Caspar et Klug (1962) sur la quasi-équivalence, une protéine située à un sommet d'ordre 5 devrait pouvoir établir cinq contacts identiques les cinq hexons péripentonaux. Il est avec difficile d'expliquer cinq positions équivalentes sur une molécule trimérique, mais il ne faut pas oublier la présence aux apex d'une autre protéine (IIIa, monomère de 66000 de PM) qui. lors de la dégradation de la capside virale, se détache en temps que les hexons péripentonaux. Elle établit même des contacts avec la base du penton, les hexons péripentonaux et la protéine VII (Everitt et al., 1975). Lors de la formation de la capside, il semble que la protéine P-IIIa soit tardivement assemblée (Morin et Boulanger, 1983), mais la protéine IIIa présence de la est indispensable à l'encapsidation (D'Halluin, 1980).

Il serait donc intéressant d'étudier les interactions entre les protéines de l'apex pour comprendre la réalisation de la symétrie dans cette partie du virus. J. Mol. Biol. (1982) 156, 927-939

# Molecular Weight of Adenovirus Serotype 2 Capsomers A New Characterization

CHRISTIANE DEVAUX<sup>1</sup><sup>†</sup>, MARTIN ZULAUF<sup>2</sup>, PIERRE BOULANGER<sup>1</sup> AND BERNARD JACROT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Virologie Moleculaire (INSERM U.233), place de Verdun 59045 Lille, France <sup>2</sup>European Molecular Biology Laboratory, Grenoble Outstation c/o CENG, LMA 85X, 38041 Grenoble, France

(Received 2 June 1981, and in revised form 23 September 1981)

We have determined the molecular weight of some of the adenovirus serotype 2 structural proteins: penton, penton base and fibre. Physical techniques, namely neutron scattering and hydrodynamical measurements, indicate that the penton base is a trimer. This is confirmed by analysis of the virion composition based on quantitative gel scanning. This finding implies either that other proteins (e.g. protein IIIa) are essential in the architecture of the fivefold vertex of the virion, or that the usual assumption that icosahedral symmetry involves identical interactions related to the symmetry of the virion does not hold.

#### 1. Introduction

The icosahedral capsid of adenovirus is considered as being made of three "major" oligomeric proteins. hexon, penton base and fibre (see reviews by Philipson & Pettersson, 1973; Ginsberg, 1979). These proteins are found in large quantities in the infected cells as soluble proteins, the penton base being associated with the fibre to form the complete penton. In addition, four other proteins found in the virion are termed "minor" capsid proteins: these are proteins IIIa, VI. VIII and IX. They have been tentatively localized within the particle (Everitt *et al.*, 1973; Boulanger *et al.*, 1979). It is generally assumed that the architecture of the capsid is defined by the three major proteins, the minor proteins having just a stabilizing role (e.g. protein IX; Jones & Schenk, 1979).

For the validity of such an hypothesis, the pentons that are located on each 5fold axis must possess a 5-fold symmetry. It is therefore usually assumed that the penton base is a pentamer. The molecular weights of the polypeptide chain of hexon, penton base and fibre have been determined by sodium dodecyl sulphate/ polyacrylamide gel electrophoresis, but only the hexon has been shown to be a trimer (Franklin *et al.*, 1971; Cornick *et al.*, 1973; Boulanger & Puvion, 1974). The

† Present address: Institut Laue-Langevin, 156X Centre de Tri, 38042 Grenoble Cédex, France.

927

0022-2836/82/120927-13 \$03.00/0

© 1982 Academic Press Inc. (London) Ltd.

## C. DEVAUX ET AL.

molecular weights of penton base and fibre have been studied by indirect methods (Pettersson & Höglund, 1969; Boudin et al., 1979; Lemay & Boulanger, 1980).

We have investigated this question by various physical methods on penton base, complete penton and isolated fibre of adenovirus serotype 2. We conclude that the penton base is a trimer. The trimeric structure of the penton base is not compatible with the generally accepted distinction between major and minor capsid proteins, but rather suggests that the apex protein IIIa has a fundamental role in the architecture of the virion or it may be that the dogma, that icosahedral symmetry ensures the maximum of identical interactions between subunits, is not strictly correct.

### 2. Materials and Methods

## (a) Virus and cells

Human adenovirus serotype 2 wild-type was originally supplied by J. F. Williams (Carnegie-Mellon Institute, Pittsburgh, PA) and the adenovirus serotype 2 temperaturesensitive mutant  $H_2 ls l25$  has been isolated after nitrous treatment of a wild-type stock and phenotypically characterized as a fibre-defective *ts* mutant (Martin *et al.*, 1978). Wild-type and *ts* mutants were grown in KB cells maintained in suspension at  $3 \times 10^5$  cells/ml in Joklikmodified F13 medium (Grand Island Biochemical Co.) supplemented with 5% (v/v) horse serum, at 37°C and 33°C, respectively.

### (b) Radioactive labelling

Wild-type mature particles and structural proteins were labelled by addition of  $[^{14}C|$ valine (285 mCi/mmol; Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) or  $[^{35}S]$ methionine (700 to 800 Ci/mmol; Amersham, U.K.) from 18 to 36 h post-infection at 0.5  $\mu$ Ci/ml in a culture medium containing 10% of the concentration of valine or methionine in normal medium. Alternatively, structural proteins were labelled with a mixture of  $[^{14}C]$ amino acids (45 to 60 mCi/milliatom of C, 2  $\mu$ Ci/ml) from 18 to 36 h post-infection, in a culture medium containing 10% of the normal amino acid concentration.

#### (c) Production and purification of adenovirus structural proteins

Hexon, complete penton and free fibre were isolated from the pool of viral material synthesized in excess by wild-type infected KB cells and purified according to the 3-step procedure described by Boulanger & Puvion (1973). The free penton base was extracted from  $H_2ts125$ -infected KB cells and purified in the same way (Boudin *et al.*, 1979). The complete penton was further purified from possible contamination of penton base by sucrose density gradient centrifugation as described by Lemay & Boulanger (1980). The manipulations were conducted at 4°C with sterilized buffers to minimize the proteolysis of the penton base. All samples used for physical methods were analysed by SDS†/polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 1).

#### (d) Determination of the extinction coefficient

The extinction coefficients of penton and fibre were determined by two independent methods.

#### (i) Amino acid analysis

A sample was first analysed for its ultraviolet light absorption in a Beekman spectrophotometer ACTA VI, and a portion of the same sample was hydrolysed in M HCl

† Abbreviation used: SDS. sodium dodecyl sulphate.

#### ARTICLE 1



FIG. 1. SDS/polyacrylamide gel electrophoresis of purified capsid proteins. (a) and (f) Control adenovirus; (b) complete penton; (c) hexon; (d) fibre; (e) penton base. (a) to (d) and (e) and (f) were separate runs.

for 24 h at  $105^{\circ}$ C after addition of a known quantity of norleucine as an internal reference. The amino acid analysis was performed on a Rank Hilger (Westwood, Margate, U.K.) amino acid analyser. The amino acid compositions of fibre, penton base, penton and hexon were similar to those published (Sundquist *et al.*, 1973: Pettersson & Höglund, 1969; Boudin *et al.*, 1979). The optical density of the sample was thus correlated with its amino acid content, and after correction for tryptophan loss, an extinction coefficient was calculated.

#### (ii) Dry weight

Portions of about 1 mg of hexon, penton and fibre whose absorbance was measured at 278 nm were dialysed extensively against distilled water, dried in a home-made cell thermostated at  $50^{\circ}$ C for 24 h under vacuum and weighed.

#### (e) Neutron scattering

The technique has been described in detail elsewhere (Jacrot, 1976). Purified protein solutions were concentrated to 2 to 5 mg/ml in a microdialysis system (Amicon B15), and dialysed against 0.01 M-sodium phosphate buffer (pH 6.8) containing 0.2 M-NaCl, or against the same buffer made in  $D_2O$  and adjusted to pD 6.8. The solutions were centrifuged at 10,000 revs/min for 10 min in a Janetzki TH II centrifuge to eliminate possible precipitate. Standard Hellma quartz cells (1 or 2 mm path-length) were used for neutron scattering and the protein concentration of samples was measured directly in these cells.

Data were collected in the D11 camera at the Institut Laue-Langevin (Ibel, 1976), equipped with a  $64 \times 64 \text{ cm}^2$  position-sensitive detector. Its response was measured by the scattering of water. The following sample-to-detector distances and wavelengths ( $\lambda$ ) were used: 1055 cm,  $\lambda = 6.22$  Å; 170 cm,  $\lambda = 7.97$  Å. Each set of data was first reduced to a radial distribution of intensity corrected for the buffer scattering and detector response.

## C. DEVAUX ET AL.

Data analysis: the method of determination of molecular weight by neutron scattering has been described by Jacrot & Zaccai (1981). It uses the scattering by water for the calibration of the incident beam. After calibration, the extrapolation to zero angle of the scattered intensity divided by the concentration gives the molecular weight. The extrapolation is obtained by measurement at small angle in the angular range where the Guinier approximation holds:

$$I(q) = I(O) \exp\left(-\frac{R_{g}^{2}q^{2}}{3}\right),$$

I(0) is the intensity for a scattering angle  $\theta = 0$ .  $(4\pi/\lambda)(\sin \theta/2)$  is the scattering vector and  $\lambda$  the neutron wavelength.  $R_g$  is the radius of gyration of the particle, which is also determined in the experiment.

#### (f) Determination of specific volume $\bar{\mathbf{v}}$

The specific volume  $\tilde{v}$  is deduced from :

$$\bar{v} = \frac{1}{d_{\mathrm{b}}} \left( 1 - \frac{1}{c} \left( d_{\mathrm{s}} - d_{\mathrm{b}} \right) \right),$$

where c is the concentration of the sample in g/l,  $d_b$  is the buffer density, and  $d_s$  is the sample density.

Buffer and sample densities were determined with a digital densimeter DMA60 (A. Paar. Graz, Austria). Calibration was made with air and distilled water. Samples, in the concentration range from 3 to 8 mg/ml, were dialysed for 24 h against 0.010 M-sodium phosphate (pH 6.8), 0.2 M-NaCl.

# (g) Determination of the sedimentation coefficient

Sedimentation coefficients were determined in an analytical centrifuge (Centriscan: MSE, Crawley, Sussex, U.K.) equipped with ultraviolet or schlieren optics depending on protein concentration (0.2 to 5 mg/mł). Measurements were performed at 49,500 revs/min and 20°C in 0.010 M-phosphate (pH 6.8), 0.2 M-NaCl. The sedimentation coefficients were reduced to standard conditions  $s_{20,w}^0$ .

#### (h) Light-scattering (photon correlation)

Measurements were performed with a 4W argon laser (Spectra Physics) and a 96-channel digital autocorrelator (Malvern Instruments, U.K.) interfaced to a Hewlett Packard 9825 calculator that allowed on-line data analysis. Samples were filtered through Nucleopore membrane filters (0·1  $\mu$ m diam.; Shandon) into a sealed quartz cell placed in a thermostated toluene bath. All experiments were performed at 22:3°C at a scattering angle of 63·S°. The measured second-order correlation function of the fluctuation scattered intensity I(t):

$$q_2(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle / \langle I \rangle^2$$

was analysed by fitting to it the following expression:

$$q_2(\tau) = 1 + B[C \exp((-D_1 q^2 \tau) + (1 - C) \exp((-D_2 q^2 \tau))]^2$$

(Zulauf & Eicke, 1979). In this expression B is an instrumental constant and  $q = (4\pi/\lambda)n$ (sin  $\theta/2$ ) is the modulus of the scattering vector ( $\lambda$  being the wavelength of the laser light, n the index of refraction of the solution, and  $\theta$  the scattering angle). There are 4 adjustable parameters: the 2 diffusion coefficients  $D_1$  and  $D_2$ , the factor C of light corresponding to  $D_1$ and B. The reduced diffusion coefficient  $D_{20,w}$  (appropriate to 20°C and the viscosity of

# MOLECULAR WEIGHT OF Ad-2 CAPSOMERS

water) is defined by the relation:

$$D_{20,w} = D \times \frac{293}{T} \times \frac{\eta(T)}{10.08},$$

where T is the temperature (K) and  $\eta$  the viscosity (mpoise) of the solvent at that temperature. This was calculated from the viscosity of water corrected for the salt by using the appropriate factors given in Tables (Handbook of Chemistry and Physics, 56th edit. CRC press).

The rationale for analysing the observed correlation function in terms of 2 exponentials is the following. Our preparations of penton were often found to contain small amounts of aggregated molecules. In light-scattering the contribution of the aggregates cannot be avoided but it can be detected in the correlation spectra by the slow relaxation  $(D_2)$  over which the fast diffusion relaxation of the monomers  $(D_1)$  is superimposed. Thus for the penton we found that 70% of the scattered light was due to the monomers and 30% to aggregates, with an equivalent radius of 580 Å. If those aggregates were globular they would scatter 380 times more light than the monomers: in terms of concentration they corresponded, therefore, to a negligible contamination. Nevertheless in photon correlation these contributions must be taken into account in order to obtain the true hydrodynamic parameters of the penton. Aggregates were much less problematic for the fibre. Their scattering contribution was so small that the  $D_2$  value would be equal to zero. We found that approximately 1% of the scattered light was due to aggregates.

#### (i) Analytical SDS/polyacrylamide gel electrophoresis

Samples were dissolved in an SDS-denaturing mixture (62.5 mM-Tris HCl, pH 6.8,  $4\%_0$  (w/v) SDS,  $10\%_0$  (v/v) 2-mercaptoethanol, 6 M-urea) and heated for 2 min at 100%C. Polypeptides were analysed on a  $17.5\%_0$  (w/v) acrylamide.  $0.08\%_0$  (w/v) bisacrylamide slab gel overlaid by a  $5\%_0$  acrylamide.  $0.13\%_0$  bisacrylamide stacking gel in the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). Electrophoresis was carried out for 16 h at 30 V in a Biorad model 220 apparatus. The gels were stained with Coomassie brilliant blue R250 and scanned with an automatic scanning densitometer (Transidyne General Corporation, RFT; Michigan, U.S.A.) at 580 nm. This analysis was rendered quantitative as explained in Results.

### 3. Results

# (a) Extinction coefficients of adenovirus major capsid proteins

The values obtained from four independent series of amino acid analyses for hexon, penton, penton base and fibre are summarized in Table 1. The value of 1.45 deduced for hexon was in good agreement with previous determinations (Day *et al.*. 1972, Grütter & Franklin, 1974). In addition, they were very similar to those obtained from dry weight determinations (results not shown).

#### (b) Neutron scattering

Figure 2 shows typical neutron scattering curves obtained with hexon, penton base, penton and fibre. In the plot of the logarithm of the intensity versus  $q^2$ , the square of the scattering vector, the linear part near the origin was used to determine both the radius of gyration  $R_g$  and the intensity at the origin I(O). For the hexon and the penton base, which have a rather globular shape (Valentine & Pereira, 1965; Lemay & Boulanger, 1980; Nermut & Perkins, 1979), this linear plot extended over a rather large angular range, allowing an accurate determination of

# C. DEVAUX ET AL.

# TABLE 1

Molecular weight (M,) and radius of gyration  $(R_g)$  of adenovirus serotype 2 capsid protein determined by neutron scattering

Capsid protein	ε <sup>1</sup> 278	М,	R <sub>g</sub> (Å)
Hexon	1.450	350.000	43+0.8
Penton base	1.145	246.000	46 + 2
Penton	1.030	362.000	94 + 6
Fibre It	0.850	156.000	75 + 11
Fibre II‡	0.850	298.000	$155\pm5$

The values were obtained from an average of at least 4 measurements performed on samples dissolved in water buffer. The protein concentrations ranging from 2 to 5 mg/ml were deduced from their absorbance at 278 nm using  $\epsilon_{1.78}^{12}$ .

† Extinction coefficients ( $\epsilon$ ) at 278 nm for 0.1% protein solution. 1 cm pathlength. Values were deduced from an average of 4 amino acid analyses.

§ Two types of fibre sample were found: one referred to as fibre If was likely to be a dimer of normal fibre (fibre I, see the text).

both  $R_g$  and I(O). The curves for the complete penton and the fibre had a much smaller linear domain, as expected for elongated structures, thereby reducing the accuracy of their molecular weight determination.

In Table 1 are summarized the values obtained for the molecular weights and the radii of gyration from neutron scattering experiments. The inaccuracy of the molecular weight determinations was mostly due to errors in estimations of protein concentration and statistical errors. They could be estimated to be about 10% for penton base, penton and fibre, and 5% for the hexon. Radii of gyration were similar

## TABLE 2

Capsid protein	ī	8×10 <sup>13</sup> (8)	$D \times 10^7$	<i>М</i> ,† from õ. s, D	<i>M</i> ,‡ from neutron
Hexon	0.725	13	3.72	310,000	350.000
Penton base	ND	ND	ND	ND	246,000
Penton	0.730	10.55	2.60	365,000	362.000
Fibre	0.703	6.09	3.10	161.000	156,000

Molecular weight (M, ) calculated from hydrodynamic parameters  $\bar{v}$ , S and D

† Comparison between the  $M_r$  values calculated from hydrodynamic parameters  $\tilde{r}$ , s and D through the Svedberg relation.

 $M_r$  determined by neutron scattering.

ND, not determined.

# ARTICLE 1



FIG. 2. Neutron scattering diagrams of (a) hexon. (b) penton. (c) penton base, and (d) and (e) fibre. Samples were measured in water buffer ((a). (b) and (c)) or D<sub>2</sub>O buffer ((d) and (e)). (a). (b). (c) and (d) The logarithm of the scattered intensity I (arbitrary units) versus scattering vector  $q^2$  at a sample to detector distance of 1055 cm. and (e) the logarithm of  $I \times q$  versus  $q^2$  at a sample to detector distance of 170 cm. This last representation is used to deduce the mass per unit length and the transverse radius of gvration.

to those obtained from preliminary studies with X-ray small-angle scattering (not shown).

The radius of gyration found for the hexon (43 Å) was smaller than that previously published: 45 Å (Lindquist, cited by Philipson & Pettersson, 1973) and 49 Å (Berger et al., 1978). The value found for the fibre species I was that expected from the geometrical dimensions observed in electron microscopy. The sample referred to as fibre II was measured in H<sub>2</sub>O and D<sub>2</sub>O and gave exactly the same scattering curve, leading to a molecular weight and a radius of gyration corresponding to a dimer, made of two fibres attached tail-to-tail (or head-tohead). The existence of such stable dimers has already been reported (Norrby. 1969; Philipson & Pettersson, 1973). On this sample, data were also collected at a larger angle ( $\lambda = 8$  Å, sample-to-detector distance of 170 cm) to determine the mass per unit length. The results are shown in Figure 2(e). A transverse radius of gyration of 8.9 Å was obtained and a mass per unit length of 530 per Å, which were in good agreement with the hypothesis that one was dealing with a tail-to-tail association of fibres.

### C. DEVAUX ET AL.

## (e) Hydrodynamic parameters

# (i) Sedimentation coefficients (s)

The values found by analytical centrifugation for hexon (13 S) and penton (10.5 S) were in good agreement with those already published (Grütter & Franklin, 1974: Pettersson & Höglung, 1969). The coefficient of the fibre was strongly dependent on concentration as previously shown for adenovirus serotype 5 fibre (Dorsett & Ginsberg, 1975) and was extrapolated for zero concentration to 6.09 S.

# (ii) Specific volumes $(\bar{\mathbf{v}})$

These are listed in Table 2. The values found for hexon and penton are very similar to those previously deduced from the amino acid composition, whereas that found for the fibre was much smaller. This was probably due to the elongated form of the fibre, which had a large number of amino acids in contact with the solvent, and to its glucosamine residues.

#### (iii) Diffusion coefficients (d)

These were determined by light-scattering. In the case of the penton the presence of aggregates resulted in some uncertainty in the determination of the coefficient of the monomer. According to the data discussed in Materials and Methods the value calculated for its  $D_{20,w}$  was  $2\cdot60(\pm0\cdot02)\times10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s. Hexon and fibre samples were free of aggregate and the  $D_{20,w}$  values were  $3\cdot72(\pm0\cdot03)\times10^{-7}$  and  $3\cdot10(\pm0\cdot04)+10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s. respectively.

Results obtained for these three parameters are summarized in Table 2 and the molecular weight of each protein was calculated from the relation:

$$M_{\rm r} = \frac{s}{D} \times \frac{RT}{(1 - \bar{\rm v}\rho)}$$

This led to molecular weights of 365,000 for the penton and 161,000 for the fibre, which were very similar to the mass deduced from neutron scattering.

#### (d) Scanning of stained adenovirus polypeptides

Adenovirus proteins can be separated in SDS/polyacrylamide gel electrophoresis according to the molecular weights of their subunits (Anderson *et al.*, 1973). It is possible to deduce the stoichiometry of the polypeptide subunits (i.e. the number of copies per virion or per apex) from the mass of protein in each polypeptide band. determined by scanning the stained gel, if the molecular weight of the capsomer subunit is known. In this work the molecular weights of the polypeptide chains were those calculated from the primary sequence of the hexon (108,113; Jörnvall *et al.*, 1981) and of fibre (61.925; Herissé *et al.*, 1981). It is still unknown for the penton base. A value of 85.000  $M_r$  is used here deduced from SDS/polyacrylamide gel electrophoresis (Anderson *et al.*, 1973; see Discussion).

# ARTICLE 1

#### **MOLECULAR WEIGHT OF Ad-2 CAPSOMERS**



FIG. 3. Dye-binding variation of adenovirus structural proteins with Coomassie brilliant blue in the conditions of the Bradford (1976) technique. Curves show the absorbance at 595 nm of hexon  $(-\triangle - \triangle -)$ , penton base  $(-\triangle - \triangle -)$  and fibre  $(-\bigcirc -\bigcirc -)$  corrected for blank as a function of the protein amount ( $\mu$ g) measured spectrophotometrically at 278 nm using the coefficients  $\varepsilon_{278}^{1^{\circ}}$  previously determined (Table 1).

However, two major drawbacks must be overcome. (1) The response of the dye used (Coomassie blue) varies widely from one protein to another (Pierce & Shulter, 1977). Protein assays were thus performed with Coomassie blue according to the technique described by Bradford (1976), using purified preparations of proteins (hexon, penton base and fibre) of which concentrations were determined from the absorbance at 278 nm. Figure 3 shows that the penton base and fibre formed less dye-protein complexes than did the hexon. This implied that the optical densities measured in the penton band and in the fibre band must be corrected by a factor of 1.10 and 1.50, respectively, to assess the relative amount of proteins in those bands.

(2) Due to the high number of hexon capsomers in the capsid (240) the hexon band was much more intense than that of the penton base and, in the pattern of the scannings, the peak of the hexon was saturated when the other bands were measureable. To overcome this difficulty gels were loaded with increasing amounts of denatured adenovirus particles (4 to 10  $\mu$ g/slot). The area of each peak on gel scans was then plotted against the protein load. For the hexon band a linear plot was obtained only with the smallest loads, whereas those for the other proteins (penton base, fibre and IIIa) only the largest loads gave accurate results (data not shown). This a linear variation of band staining versus protein load might be was obtained only with the smallest loads, whereas for the other proteins (penton base, fibre and IIIa) only the largest loads gave accurate results (data not shown). This a linear variation of band staining versus protein load might be shown). Thus a linear variation of band staining versus protein load might be

Since the number and the molecular weights of hexon capsomers in the virus particle are known, it was possible to deduce the total mass of the other proteins present in the virion and the number of subunits at each apex. The results are shown in Table 3. The data, although not very accurate, were incompatible with the presence of five polypeptide chains of penton base at each apex, but strongly suggested, in agreement with the molecular weight determination, that the penton

# C. DEVAUX ET AL

# TABLE 3

Capsid protein	Protein mass per virion (×10 <sup>-6</sup> )	Protein mass per apex (×10 <sup>-6</sup> )	<i>M</i> <sub>1</sub> of polypeptide subunit (×10 <sup>-3</sup> )	Number of copies per apex
Hexon	77.8†	0	108‡	0
Penton base	3.1	256	85§	3-0
IIIa	7.3	608	66§	9.2
Fibre	1.6	133	62‡§	2-2

Molecular weight and stoichiometry of the major adenovirus serotype 2 capsid polypeptides determined by scanning of a stained SDS/polyacrylamide gel

Data correspond to several gel scannings of stained proteins.

 $\dagger$  The amount of protein present in each virus polypeptide band was determined from the area of its peak on a gel scanning pattern, assuming that the hexon band represents 240 capsomers each made of a trimetric association of a polypeptide subunit of 108.113, namely a protein mass of  $77.8 \times 10^6$ /virion. Except for protein IIIa, which was not calibrated for dye-binding, results were corrected by a factor determined in experiments described in Fig. 3.

<sup>‡</sup> Determined from amino acid sequence (see the text).

§ According to Anderson et al. (1973).

base was a trimer. The data for protein IIIa presented a greater error, since this protein was not available in sufficient quantities in a purified form to measure its sensitivity to Coomassie blue.

# (e) Scanning of autoradiograms of labelled polypeptides in adenovirus particle and in soluble penton

 $[^{14}C]$ valine-labelled adenovirus,  $[^{35}S]$ methionine-labelled or  $[^{14}C]$ amino aeidlabelled penton purified in sucrose gradients (fraction 10.5 S) were dissociated with SDS and electrophoresed on an SDS/polyacrylamide gel (10,000 to 50,000 cts/min per gel slot) and autoradiograms were scanned at different times of exposure. The relative amount of radioactivity in penton base, fibre and protein IIIa was measured both in the virus and in the soluble penton. Table 4 shows the different polypeptide ratios obtained. Correction was made for the difference in valine or methionine content reported in the literature (Sundquist *et al.*, 1973; Boudin *et al.*, 1979; C. Devaux, unpublished data).

The relatively wide variation in results suggested that the scanning of autoradiographed gels was a rather imprecise technique. The experimental ratio of penton base to fibre varied from 1.68 to 1.25. This lay between the expected ratio of 1.35 if the penton base was a trimer and the fibre was a trimer (molecular weights of penton base and fibre polypeptides are 85,000 and 62,000, respectively) and of 2.06 if the penton base was a trimer and the fibre was a dimer. The ratio for pentamer to trimer would be 2.28. The ratio of penton base to protein IIIa was 0.94. this corresponded to 4.1 copies of protein IIIa at each apex, if the penton base was a trimer. This value was compatible with the results of Boudin *et al.* (1980), who suggested five copies of protein IIIa at each apex.

# MOLECULAR WEIGHT OF Ad-2 CAPSOMERS

TABLE 4

Stoichiometry of penton base (polypeptide III). fibre (IV) and protein IIIa in a lubelled adenovirus particle and soluble 10.5 S penton

Viral entity	Labelling <sup>†</sup>	Polypeptid	Polypeptide ratio <sup>‡</sup>	
Soluble penton	[ <sup>35</sup> S]Met [ <sup>14</sup> C]amino acids	III : IV III : IV	1.51 1.25 1.68	
Virion	[ <sup>14</sup> C]Val	III : IIIa IV : IIIa IV : IIIa	0.94	

Figures given are results of scanning gel autoradiograms (average of 6 gel scannings).  $\uparrow$  Proteins were labelled with [<sup>35</sup>S]methionine. [<sup>14</sup>C]valine or [<sup>14</sup>C]amino acids.

‡ Polypeptide ratios were corrected for amino acid content (valine or methionine).

# 4. Discussion

It was found by two completely independent physical methods that the molecular weight  $(M_r)$  of the complete penton of the adenovirus servity 2 was around 365.000. Such a value is incompatible with the usual assumption that the penton base is a pentamer (theoretical  $M_r$ , 425,000), associated to form a complete penton unit with a fibre considered as a trimer ( $M_r$ , 186,000). The penton base was found to have a molecular weight of 245,000 suggesting that it is a trimer (theoretical  $M_r$ , 255.000). This interpretation was in good agreement with the molecular weight found for the complete penton, which would then be made of a trimeric penton base, and of a trimeric or possibly dimeric  $(M_r, 124,000)$  fibre. These data were obtained from a physical analysis of soluble structural components isolated from the pool of excess proteins present in the infected cell. However, these results were also confirmed by stoichiometric analysis of the virion and pentor polypeptides in SDS/polyacrylamide gels. The method of gel analysis used here should provide a quantitative insight of the adenovirus polypeptide composition if a test for dye-binding was first carried out with purified virus proteins. The results of such an analysis also excluded a pentameric penton and in contrast supported a trimeric structure. This supposed a value of  $85,000 M_r$  for the subunit of the penton base deduced from SDS/polyacrylamide gel electrophoresis. Indeed, the estimation of molecular weight by gel may be incorrect, in particular if the polypeptides are glycosylated or phosphorylated. However, for the fibre, which is glycosylated (Ishibashi & Maizel, 1974), the molecular weight deduced from SDS/polyacrylamide gel is in perfect agreement with that found by sequence (Herissé et al., 1981). In addition, the fibre polypeptide of the temperature-sensitive mutant H\_ds142 (Ginsberg & Young, 1977), which is not glycosylated at the non-permissive temperature, shows the same apparent molecular weight in SDS/polyacrylamide gel as the wild-type fibre (H. S. Ginsberg, personal communication). The sequence of the penton base is not determinated but this polypeptide is neither glycosylated nor phosphorylated. A new calibration of gels using proteins with known primary sequence as markers shows some variations of molecular weight (88,000 and 75,000:

#### C. DEVAUX ET AL.

Persson and Van der Eb. respectively, eited by Philipson, 1979) but even with the smallest molecular weight a pentamer would not be compatible with our results. In addition, the faint band of 80,000 due to proteolysis of the penton base (Fig. 1) is insufficient to explain the difference between the expected  $M_r$  value of 425,000 and our value of 246,000.

A value of 370,000 to 400,000 for the complete penton of adenovirus serotype 2 has been obtained from sedimentation to equilibrium (Pettersson & Höglund, 1969). This value is in fair agreement with our own determinations. Other reported values have been deduced from much less quantitative methods such as gel filtration chromatography and sedimentation through sucrose gradients (Lemay & Boulanger, 1980): a molecular weight of 660,000 was thus attributed to the complete penton but only 286,000 to the penton base. Our neutron value of 350,000 for the hexon is in excellent agreement with its well-established trimeric structure and the molecular weight of the subunit, thus providing a useful control for our methods.

The results obtained with the fibre were less clear. Two types of sample were revealed by neutrons. In the first a value of 156,000  $M_i$  was found. In the second sample the observed molecular weight and the radius of gyration were twice as large. This probably corresponded to aggregates of two fibres attached by one of their extremities. Spontaneously occurring dimers of adenovirus fibres, bound tailto-tail, and provoking direct haemagglutination, have been described (Norrby, 1969). The measurement of the mass per unit length supported this interpretation. The molecular weight for the complete penton is, within experimental errors, compatible with the sum of the molecular weights of the penton base and of the fibre, although somewhat smaller. The molecular weight of the fibre determined by our physical techniques (156,000 to 161,000) fits neither with a dimer (124,000) nor a trimer (186,000). A previous value of 207,000 obtained from sedimentation to equilibrium (Sundquist *et al.*, 1973) suggested a trimer. The results of gel scanning exclude the pentameric oligomer for the penton base but could not resolve unambiguously the problem of the dimer or trimer for the fibre.

The important finding, however, is the trimeric character of the penton base. This appears at first to be at variance with the postulated icosahedral symmetry and the assumption that viruses conserve contacts between subunits (Caspar & Klug, 1962). A trimeric penton cannot have five identical contacts with the five surrounding hexons. The presence of protein IIIa, apparently in five copies, at each apex suggests that this species, not the penton has a fundamental role in contacting the five peripentonal hexons. Indeed, we have failed to observe by physical methods the formation of complexes between hexon and penton. Difficulties in purifying sufficient protein IIIa have made it so far impossible to study its interaction with hexon and penton. We note that the dimeric or trimeric character of the fibre creates a symmetry-matching problem, and our present results displace this matching problem to protein IIIa. We also note that the demonstration that hexons are trimers was itself surprising, but readily explained by assuming regular P3 contacts within a group of nine hexons and quite different contacts along edges between groups of nine forming the adenovirus shell. This is then confirmed by X-ray studies (Berger et al., 1978) and electron microscopy (Boulanger & Puvion, 1974; Nermut & Perkins, 1979).

#### MOLECULAR WEIGHT OF Ad-2 CAPSOMERS

This work was supported by the INSERM (U. 233), the CNRS (ERA 225), the Université du Droit et de la Santé (UER III), the DGRST, contract 80-7-0290 and the Institut Laue-Langevin. We are grateful to C. Berthet-Colominas for X-ray measurements. We thank E. Truche for amino acid analysis, C. Richet for dry weight determinations and D. Petite and C. Cousin for providing cell cultures and virus stocks.

#### REFERENCES

Anderson, C. W., Baum, P. R. & Gesteland, R. F. (1973). J. Virol. 12, 241-252.

Berger, J., Burnett, R. M., Franklin, R. M. & Grütter, M. (1978). Biochim. Biophys. Acta. 535, 233-240.

Boudin, M. L., Moncany, M., D'Halluin, J. C. & Boulanger, P. (1979). Virology, 92, 126-138. Boudin, M. L., D'Helluin, J. C. Courin, C. & Boulanger, P. (1980). Virology, 94, 144–156.

Boudin, M. L., D'Halluin, J. C., Cousin, C. & Boulanger, P. (1980). Virology, 101, 144-156. Boulanger, P. & Puvion, F. (1973). Eur. J. Biochem. 39, 37-42.

Boulanger, P. & Puvion, F. (1974). Eur. J. Biochem. 43, 465-470.

Boulanger, P., Lemay, P., Blair, G. E. & Russell, W. C. (1979). J. Gen. Virol. 44, 783-800.

Bradford, M. M. (1976). Anal. Biochem. 72, 248-254.

Caspar, D. L. D. & Klug, A. (1962). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1-24.

Cornick, G., Sigler, P. B. & Ginsberg, H. S. (1973), J. Mol. Biol. 73, 533-537.

Day, L. A., Franklin, R. M., Pettersson, U. & Philipson, L. (1972). Eur. J. Biochem. 29, 537– 541.

Dorsett, P. H. & Ginsberg, H. S. (1975). J. Virol. 15, 208-216.

Everitt, E., Sundquist, B., Pettersson, U. & Philipson, L. (1973). Virology, 52, 130-147.

Franklin, R. M., Pettersson, U., Akervall, K., Standberg, B. & Philipson, L. (1971). J. Mol.

Biol. 57, 383-391.

Ginsberg, H. S. (1979). Comp. Virol. 14. 409-448.

Ginsberg, H. S. & Young, C. H. S. (1977). Comp. Virol. 9, 27-88.

Grütter, M. & Franklin, R. M. (1974). J. Mol. Biol. 89, 163-178.

Herisśe, J., Rigolet, M., Dupont de Dinechin, S. & Galibert, F. (1981). Nucl. Acids Res. 9, 4023-4042.

Ibel, K. (1976). J. Appl. Crystallogr. 9, 630-643.

Ishibashi, M. & Maizel, J. V. (1974). Virology, 58. 345-361.

Jacrot, B. (1976). Rep. Prog. Phys. 39, 911-953.

Jacrot, B. & Zaccai, G. (1981). Biopolymers, 20, 2413-2426.

Jones, N. & Schenk, T. (1979). Cell. 17, 683-689.

Jörnvall, H., Akusjärvi, G., Aleström, P., von Bahr-Lindstrom, H., Pettersson, U., Appella, E., Fowler, A. V. & Philipson, L. (1981). J. Biol. Chem. 256, 6181-6186.

Laemmli, U. K. (1970). Nature (London), 227, 680-685.

Lemay, P. & Boulanger, P. (1980). Ann. Virol. Inst. Pasteur, 131 E No. 3, 259-277

Martin, G. R., Warocquier, R., Cousin, C., D'Halluin, J. C. & Boulanger, P. (1978). J. Gen. Virol. 41, 303-314.

Nermut, M. V. & Perkins, W. J. (1979). Micron, 10, 247-266.

Norrby, E. (1969). J. Gen. Virol. 5, 221-236.

Pettersson, U. & Höglund, Q. (1969). Virology, 39, 90-106.

Philipson, L. (1979). Advan. Virus Res. 25, 357-405.

Philipson, L. & Pettersson, U. (1973). Prog. Exp. Tumor Virus Res. 18, 1-55.

Pierce, J. & Shulter, C. H. (1977). Anal. Biochem. 81, 478-480.

Sundquist, B., Pettersson, U., Thelander, L. & Philipson, L. (1973). Virology, 51, 252-256

Valentine, R. C. & Pereira, H. G. (1965), J. Mol. Biol. 13, 13-20.

Zulauf, M. & Eicke, H. F. (1979). J. Phys. Chem. 83, 480-486.

#### Edited by V. Luzzati

ARTICLE 2

# Vol. 110, No. 3, 1983 BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS February 10, 1983 Pages 913-918

# NATIVE MOLECULAR WEIGHT OF ADENOVIRUS PROTEINS : ON THE OLIGOMERIC STRUCTURE OF THE FIBER

# Pierre BOULANCER and Christiane DEVAUX\*

## Unité de Virologie Moléculaire de l'INSERM, U. 233, Place de Verdun 59045 Lille Cédex, France

Received December 2, 1982

Summary. Fluorescamine-modification of amino groups was used to eliminate the influence of basic charge on the final migration position of protein's in alkaline pH polyacrylamide gradient gel electrophoresis. As applied to adenovirus structural components, this type of analysis suggested the fiber to be composed of three identical subunits. The trimeric nature of both penton base and fiber therefore displaces the problem of symmetry mismatching to penton base and surrounding hexons at each vertex of the adenovirus icosahedron.

The quaternary structure of adenovirus capsid proteins has been most often deduced from the molecular weight of the constituting polypeptide subunit, as determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of SDS-denatured proteins, and/or from the physical parameters S, D, and V obtained for the isolated proteins in their native structure (reviewed in 1, 2). Electron microscopy of negatively stained samples can also confirm the subunit composition of certain virus macromolecular components. This is the case for adenovirus hexon, in which three subunits can be discerned, either in the native capsomer (3), or after cross-linking with bifunctional reagent (4). The trimeric structure of the hexon is not surprising since it has six neighbours in the virion (1,3). A three-fold symmetry is compatible with a hexavalent capsomer.

However, two recent studies have shown that the subunit composition of a virus morphological component could neither be inferred from its location on a symmetry axis, nor from the number of its nearest neighbours. X-rays crystallographic studies on polyoma virus capsid have suggested that six-coordinated capsomers can be pentamers (5). Adenovirus penton base capsomer, which is positioned on the capsid five-fold axis and is pentavalent, was thus far considered as a pentameric protein (1,6). Neutron scattering and sedimentation data have recently revealed the penton base to be composed of three polypeptide subunits (7), a result which was consistent with previous sedimentation data have recently revealed the penton base to be composed of three polypeptide subunits (7), a result which was consistent with previous sedimentation data have recently revealed the penton base to be composed of three polypeptide subunits (7), a result which was consistent with previous sedimentation data have recently revealed the penton base to be composed of three polypeptide subunits (7), a result which was consistent with previous sedimentation data have recently revealed the penton base to be composed of three polypeptide subunits (7), a result which was consistent with previous sedimentation data have recently revealed the penton base to be composed of three polypeptide subunits (7).

Present address : Institut Laue-Langevin, 156 X Centre de Tri, 38042 Grenoble Cédex, France

mentation and gel filtration analyses (2), and with the stoichiometric analysis of penton base polypeptide within the mature virion (7).

Although the molecular weight of roughly globular molecules such as hexon or penton base can be unambiguously determined by neutron scattering, major uncertainties remain for elongated or fibrous proteins such as adenovirus fiber (7). The neutron scattering diagrams obtained with the fiber were compatible with a protein molecule constituted of either two or three identical polypeptide subunits of molecular weight 62,000 (8,9). In the experiments reported here, the oligomeric structure of adenovirus type 2 fiber was re-investigated by a purely biochemical approach. It consisted of a molecular sieve electrophoresis of chemically modified fiber. The modification with fluorescamine of fiber amino groups eliminated the influence of basic charge on its mobility in polyacrylamide gradient gel electrophoresis at alkaline pH.

# MATERIALS AND METHODS

. Fluorescamine labeling of proteins. Fluorescamine reaction was performed as follows. A freshly prepared solu- tion of fluorescamine (Hoffman - La Roche Inc.) in acetone at a concentration of 5 mg per ml was added to the protein sample dissolved in 0.2 M sodium bicarbonate buffer, pH 8.2, while stirring vigorously on a Vortex mixer. Usually twice 5  $\mu$ l of the fluorescamine solution was added to 50  $\mu$ l of protein sample at 0.5-1.0 mg/ml. Fluorescamine instantaneously reacted with primary amines. Excess reagent rapidly hydrolyzed to nonfluorescent products. Acetone was then evaporated under a current of nitrogen, and glycerol added up to 15 % final concentration, to allow layering on top of the polyacrylamide gel.

. Polyacrylamide gel electrophoresis. The alkaline gel system consisted of a polyacrylamide gradient slab gel (5-30 %) with an acrylamide to bisacrylamide ratio of 50 : 1.33, cast in 0.385 M Tris-HCl buffer, pH 9.4. The resolving gradient gel was overlaid by a spacer gel made of 5 % polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide ratio of 50 : 1.33) in 0.3 M Tris-HCl, pH 8.9. The tank buffer was 0.05 Tris-glycine, pH 9.4. Electrophoresis was performed at a constant voltage of 10 V/cm and arrested when the visible band of ferritin marker had migrated a distance of 1.5 - 2.0 cm from the top of the gel (usually 72-96 h). The gel was examined and photographed under UV light at 366 nm, then fixed and stained with Coomassie blue R-250.

. Molecular weight markers. Standard proteins were reacted with fluorescamine before being used as molecular weight markers (10). They were : hog thyroglobulin (669 Kd) ; horse spleen ferritin (440 Kd) bovine fibrinogen (390 Kd) ; adenovirus type 2 hexon (330 Kd, in its native state) ; beef liver catalase (232 Kd) ; beef heart lactate dehydrogenase (140 Kd) ; rabbit muscle phosphorylase B (92.5 Kd) ; aldolase (158 Kd ; composed of four subunits) ; bovine serumalbumin (67 Kd for the monomer, 134 Kd for the dimer)) ; ovalbumin (43 Kd). Ferritin, catalase, bovine serum albumin, aldolase and ovalbumin were separate components of the calibration kit Combithek II (Boehringer). Phosphorylase B was contained in the LMW protein calibration kit (Pharmacia Fine Chemicals). Thyroglobulin and lactate dehydrogenese were present in the HMW protein calibration kit (id), along with bovine serumalbumin, catalase and ferritin. Adenovirus type 2 hexon was ourified as previously described (11). Bovine fibrinogen was a gift from Dr. L. Tranqui (CENG, Grenoble).

## RESULTS

As shown in Fig. 1, a linear calibration curve was obtained with fluorescamine-modified standard proteins in the range of molecular weights from 80,000 to 660,000 daltons. A discrete break was visible in the curve between high and low molecular weight domains. Fluorescamine-labelled hexon migrated as a protein of molecular weight 330,000-350,000 daltons, a value consistent with the data previously reported (2) and with the amino acid sequence (12).



Figure 1 : Calibration curve of proteins electrophoresed in a 5-30 % polyacrylamide gradient gel run in alkaline pH. Standard proteins were : thyroglobulin (Tg, 670 Kd) ; ferritin (Ft, 440 Kd) bovine fibrinogen (Fg, 390 Kd) ; adenovirus 2 hexon capsomer (Hx, 330 Kd) ; catalase (Ct, 232 Kd) ; aldolase (AI, 158 Kd) ; lactate dehydrogenase (Ld, 140 Kd) ; phosphorylase b (Ph, 92.5 Kd) ; serumalbumin (Sa, 67 Kd) ; ovalbumin (Ov, 43 Kd). Sa-1 corresponded to the serumalbumin monmer, Sa-2 to its dimeric form. Aldolase, which is normally composed of 4 subunits of 39 Kd (AI-4) dissociated into isolated subunits (AI-1) and pairs of subunits (AI-2) and reaggregated into multiple of subunit pairs (hexamers, AI-6, and octamers, AI-8). Note the curve break at about 80,000 between high molecular weight and low molecular weight domains. The arrowhead indicates the migration position of adenovirus 2 fiber (Fb) in its native form. Inset : gradient gel photographed under UV light at 366 nm showing fluorescamine-labeled adenovirus 2 hexon (a), fiber (b) and the series of oligomers of aldolase subunits (c). Note the presence of fiber aggregates on top of slot (b), a phenomenon which has been often observed (1).

After fluorescamine modification and prolonged electrophoresis in an alkaline gradient gel, no significant difference in electrophoretic migration was observed between globular and fibrous proteins : fibrinogen was positioned on the curve at its theoretical molecular weight of 390 K.

Fluorescamine-modified adenovirus fiber migrated slightly slower than aldolase in its native enzymatic form (i.e. tetrameric association of 40 Kd subunit) and significantly faster than (232 Kd) catalase and aldolase subunit hexamer (240 Kd). The calibration curve gave fiber a molecular weight of 165,000 daltons (Fig. 1), a value compatible with a trimer, and too high for a dimer of a 62 Kd subunit.

# DISCUSSION

The electrophoretic mobility of a non-denatured protein sample depends upon its molecular weight and its net electric charge. The influence of the intrinsic electric charge is far from being negligible. This is examplified by electrophoretic analysis of adenovirus capsid proteins : the fiber migrates in non-denaturing homogeneous acrylamide gel slower than the penton base and



Figure 2 : Comparative migration of unmodified (A) and fluorescamine-modified (B) proteins in polyacrylamide gradient gel. Get (A) ; (a,d,g) : HMW calibration kit proteins (thyroglobulin, ferritin, catalase, lactate dehydrogenase, and albumin) ; (b,c) : adenovirus 2 fiber ; (e) : adenovirus 2 penton ; (f) : adenovirus 2 hexon. Gel (B) ; (a) ferritin ; (b,c) adenovirus 2 hexon ; (d) adenovirus 2 fiber ; (e) HMW calibration kit markers ; (f) bovine fibrinogen. Both gels, made of 5-30 % polyacrylamide, were dried and stained with Coomassie blue R-250. The molecular weights of protein markers are given in kilodaltons. Arrowheads indicate the position of the fiber.

hexon of higher molecular weights (6,11). This major drawback has been partly overcome by electrophoresis in acrylamide gradient gel. Prolonged electrophoresis in a pore gradient gel minimizes the influence of the proteins's charge on their final migration position (13). However, this was not the case for the adenovirus structural proteins. As shown in Fig. 2A, native fiber migrated slower than hexon, even in gradient gel. This is why it appeared necessary to eliminate the electric charge parameter from the electrophoretic analysis.

The modification of proteins amino groups will increase their intrinsic negative charge and at alkaline pH all the peptides and proteins will migrate towards the anode. Their final migration will then only depend upon their molecular weight. Fluorescamine has been largely used for fluorimetric assay of amino acids (14) or for fluorescent labeling of peptides and proteins (15,16). The use of fluorescamine offers at least two advantages : (i) it renders the proteins visible under UV light during and after migration in gel ; (ii) it blocks the basic amino groups. After fluorescamine-labeling, the native hexon and fiber migrated in alkaline gradient gel as proteins of 330,000 and 165,000 daltons, respectively (Fig. 2B).

The quaternary structure of the fiber remained a matter of controversy. Cross-linking of protein samples with a variety of bifunctional reagents and subsequent analysis in SDS-polyacrylamide gel, a method, profitably applied to the determination of the hexon oligomeric structure (4), was found to be unsuccessful in the case of the fibre : no discrete band of preferred oligomeric species was displayed, even when electrophoresis was performed in gels of low acrylamide concentration and/or of low degree of bisacrylamide cross-linking (unpublished data). It has been recently shown that in chemical cross-linking of proteins, cooperative cross-linking events can occur, resulting in mixtures of covalently bound aggregates (17,18). This probably explains why most of the cross-linked fiber material remained on top of the acrylamide gel, whatever the experimental condition, viz, when fiber was reacted at low concentration to minimize the intermolecular cross-links, or when low reagent concentration was used to decrease the cooperativity phenomenon (not shown).

The results of electrophoretic analysis of fluorescamine-modified adenovirus fiber analyzed in alkaline polyacrylamide gradient gel were thus in good agreement with those obtained with conventional biophysical methods suggesting a trimeric structure for adenovirus fiber (2,19). The trimeric nature oi poth fiber and penton base therefore displaces the symmetry-matching problem to the penton base and surrounding hexons at each apex of the adenovirus capsid.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the INSERM (U. 233), the CNRS (ERA. 225), the Université du Droit et de la Santé (UER. III), and the DGRST (Contrat 80-7-0290). We thank G. Duvillier for valuable advice in fluorescamine-labeling and B. Jacrot for fruitfull discussions.

#### REFERENCES

- Philipson, L. and Lindberg, U. (1974), Reproduction of adenoviruses. In 1. Comprehensive Virology (H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, eds) Vol. 3, pp 143-227, Plenum Press. New York.
- Lemay, P. and Boulanger, P. (1980), Ann. Virol. Inst. Pasteur 131E, 2. 259-277.
- 3.
- 4.
- Nermut, M.V. (1980), Arch. Virol. 64, 175-196. Boulanger, P., and Puvion, P. (1974), Eur. J. Biochem. 43, 465-470. Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L.D., and Murakami, W.T. (1982), 5. Nature (London) 295, 110-115.
- Boudin, M.L., Moncany, M., D'Halluin, J.C. and Boulanger, P. (1979), 6. Virology 92, 125-138. Devaux, C., Zulauf, M., Boulanger, P., and Jacrot, B. (1982), J. Mol.
- 7. Biol. 156, 927-939.
- Anderson, C.W., Baum, P.R., and Gesteland, R.F. (1973). J. Virol. 12, 8. 241-252.
- Hérissé, J., Rigolet, M., Dupont de Dinechin, S., and Galibert, F. 9. (1981), Nucleic Acids Res. 9, 4023-4042. 10. Righetti, P.G., Tudor, G. and Ek, K. (1981), J. Chromatog. 220,
- 115-194.
- Boulanger, P. and Puvion, P. (1973), Eur. J. Biochem., 39, 37-42.
   Jörnvall, H., Akusjärvi, G., Aletröm, P., Von Bahr-Lindstrom, H., Pettersson, U., Appela, E., Fowler, A.V., and Philipson, L. (1981), J. Biol. Chem. 256, 6181-6186.
- Margolis, J., and Wrigley, C.W. (1975), J. Chromatog. 106, 204-209. 13.
- Stein, S., Bohlen, P., Dairman, W. and Undenfriend, S. (1973), Arch. 14.
- Biochem. Biophys. 155, 202-212.
  Böhlen, P., Stein, S., Dairman, W. and Undenfriend, S. (1973). Arch. Biochem. Biophys. 155, 213-220.
  Rosemblatt, M.S., Margolies, M.N., Cannon, L.E., and Haber, E. (1975),
- Anal. Biochem. 65, 321-330.
- Bäurmert, H.G., Sköld, S.E., and Kurland, C.G. (1978). Eur. J. Biochem. 89, 353-359.
   Nygård, O., and Nika, H. (1982), EMBO Journal 1, 357-362.
- Sundquist, B., Pettersson, U., Thelander, L. and Philipson, L. (1983), 19. Virology 51, 252-256.
Crystal packing and stoichiometry of the fibre protein of adenovirus type 2

Christiane DEVAUX (1)\*, Carmen BERTHET-COLOMINAS (2),

Peter A. TIMMINS (3), Pierre BOULANGER (1) and Bernard JACROT (2).

(1) Laboratoire de Virologie Moleculaire (INSERM U233)

Place de Verdun, 59045 Lille, France

(2) European Molecular Biology Laboratory

Grenoble Outstation, c/o Institut Laue Langevin,

Grenoble, France

(3) Institut Laue Langevin

156x, 38042 Grenoble Cedex, France

\* Present address : European Molecular Biology Laboratory,

Institut Laue Langevin, 156x, 38042 Grenoble Cedex, France

The adenovirus fibre is an elongated protein responsible for the attachment of the virus to its receptor on the cellular membrane (Philipson et al., 1968; Hennache and Boulanger , 1978) and for viral hemagglutinating activity (Pettersson et al., 1968; Norrby, 1969). In the virus, the fibre is non-covalently linked to another protein, the penton base, to form the penton which is situated at each of the twelve five-fold axes of the icosahedral capsid (Horne et al., 1959; Valentine and Pereira, 1965). The polypeptide of fibre of adenovirus type 2 consists of 581 amino acids the for which the sequence is known (Herisse et al., 1981). A small amount of glucosamine is also associated with the fibre (Ishibashi and Maizel 1974). Although a molecular weight of 207000 daltons has been obtained from equilibrium sedimentation (Sundquist et al., 1973) for the native fibre, suggesting a trimeric structure, our previous studies by neutron scattering and hydrodynamic methods showed a molecular weight not higher than 156000-161000 which indicated difficulties in the use of these physical methods such an elongated molecule and left open for the possibilities that the fibre was a dimer or a trimer (Devaux et al., 1982).

We report here the crystallization of the fibre protein from adenovirus type 2. Although the crystals obtained are not yet large enough for a high resolution X-ray structure determination we have been able to obtain electron micrographs of stained crystals and X-ray powder patterns. The preparation and some electron microscopy of crystals from adenovirus type 5 fibre protein has previously been reported by Mautner and Pereira (1971). Fibre protein was purified

from the excess pool of proteins synthesized during KB cell infection according to the three step method of Boulanyer and Puvion (1974). Concentrated fibre (5-8 mg/ml) was dialysed overnight against lØmM sodium phosphate pH 6. We were not able to obtain crystals by the method of Mautner and Pereira (1971) but successful crystallization was achieved by the hanging drop method using 3-5% polyethylene glycol 6000 (MacPherson, 1976). Flat triangular crystals of about 200-500 μm in 2 dimensions but only about 10 μm thick appeared after one or two weeks. These crystals, negatively stained with 1% uranyl acetate were examined by electron microscopy. X-ray powder patterns of the native crystals were also obtained.

Electron microscopy (E.M.) of fibre crystals showed two principal views. The most common view was that shown in Fig. It is characterised by four strong bands with a total 1a. width of 215 A. The set of four bands is regularly repeated with a period which varies from picture to picture between 580 Å. This variation is due to that of 49Ø and the dark domain between the successive sets.Within the dark domain a periodicity of 38Å is observed perpendicular to the 58ØÅ direction. Another view of the crystals, observed less frequently is that shown in Fig. 2. These images have been submitted to filtration techniques to improve the pattern. The filtered image (Fig. 2c) shows an hexagonal lattice with a=b=76We interpret these two categories of pictures (1a 2a) as due respectively to the longitudinal and lateral and packing of the fibre.

Individual fibre molecules appear in the E.M. as structures of about 250Å in length comprising a head of dimensions 30-40Å and a tail of about 200Å long by 15-20Å

wide (Valentine and Pereira, 1965). We attribute the strong banding in Fig. la to a side by side assembly of fibre heads.

X-ray powder diffraction patterns extending to approximately 12 A resolution are shown in Fig. 3. They can indexed unambiguously on a lattice having unit cell be dimensions of a=b=77 Å, c=590 Å,  $\alpha = \beta = 90^{\circ}$  and  $\gamma = 120^{\circ}$ , strongly suggesting a hexagonal or trigonal space group. However, a centered orthorhombic space group with  $b=a\sqrt{3}$  would give rise to the same set of lines. These dimensions are consistent with those observed in the electron-micrographs (Fig. 1 and Fiq. The projection shown in Fig. 1 suggests 2). that the projection of the electron density along the fibre direction can be approximated to a step function of width of about 200 A (the four strong bands) repeating on a lattice of 590 Å. To that the X-ray and E.M. models were similar a stepcheck function of varying width was fitted to the intensities of the ØØ1 reflections for which the first 8 orders are well separated from all general hkl reflections. The best fit was obtained for a step width of 205  $\mathbf{\hat{A}}$ .

To determine the symmetry of the crystal we have several pieces of evidence. The E.M. pictures (Fig.2) of the projections on to a plane perpendicular to the fibre axis, very strongly suggest a 3-fold parallel to fibre the This makes an hexagonal or trigonal space group direction. much more likely than an orthorhombic one. The lack of any systematic absences in the  $\emptyset \emptyset l$  reflections shows that this cannot be a screw axis. In addition Fig. la shows an apparent mirror symmetry suggesting that there is a 2-fold axis The possible perpendicular to the fibre direction. space groups are therefore P312, P321 or P622 as space groups containing centres of inversion must also be excluded. It is clear from Fig. la and the space group considerations that there must be at least two molecules in the asymmetric unit as the four strong bands clearly correspond to projections of the fibre heads. We can exclude P622 as it would be impossible to accomodate 6 heads in the same plane as required by this space group. The E.M. picture corresponding to the projection parallel to the fibre axis favours the space group P321 rather than P312 as it shows equal densities at the positions (1/3, 2/3) and (2/3, 1/3). The latter space group would normally have different projected densities about these points.

There are altogether four possible longitudinal packing schemes compatible with a two-fold axis perpendicular to the Two of these packings are shown in figures fibre direction. lc and ld. Molecules 1 and 2 are two independent molecules in the asymetric units and molecules 3 and 4 are their symmetry equivalents related by the two-fold axis. The two other possible packings are deduced from these by having molecule 2 pointing in the opposite direction .If one considers the surface of the basal plane of the unit cell, the number of molecules per unit cell (see below), the size of the heads and of the tails, it is clear that only one tail can go through а fibre heads. This will be the case with the two plane of packings shown here. In figure 4 we show a 3-dimensional model consistent with the packing of figure lc the which is and symmetry imposed by space group P321. The positions of the this model, have been calculated to molecules in have the most regular packing of the heads in planes 2 and 3 and let tails of molecules 1 and 4 go through the holes left the in planes 2 and 3 respectively. In this model the projections of molecules 1 and 4 are lying on a two-fold axis (or are very close to). This is possible as these two molecules have no overlap in the longitudinal projection. An alternative model, deduced from this one by a permutation of the packing planes of molecules 1 and 2 and of molecules 3 and 4, is less likely as molecules 2 and 3 do overlap in the longitudinal projection, and thus the variability of the longitudinal periodicity will be difficult to understand.

The alternative longitudinal packing of figure ld will give rise to another 3-d model. In this case tails of molecules 1 must go through planes of heads of molecules 4 and vice-versa. This will be achieved if these two molecules are organized following the packing scheme A and C. Then molecules 2 and 3 will be packed in the same way: molecules 1 and 2 (and molecules 3 and 4 ) having the same projection. For the same reason as above, a model with molecules 2 and 3 packed following B is less likely. We have no evidence at present in favour of one model or the other. We may note that a model with a molecule lying on a 3-fold axis, the other in a general position, although compatible with the crystal density, is very unlikely, as it would generate in the E.M. picture bands of different protein density, a feature that seems incompatible with the images. A structure with two molecules lying on the 3-fold axis is incompatible with the density measurements (see below).

In both models there are in each plane holes which are likely to be filled with uranyl acetate in negative staining. These holes are organized on a lattice which in projection can give rise to periodicities of  $77\sqrt{3}/2$  (66)  $\stackrel{\text{R}}{\xrightarrow{}}$ , 77/2 (38)  $\stackrel{\text{R}}{\xrightarrow{}}$  etc. The periodicity of 38 Å observed in several E.M. pictures can then be understood. With the 3-d models that we propose, these periodicities will be in register from plane to plane. The 66 Å periodicity is seen with a poor contrast, in a few pictures and with adjacent planes out of register. This is what is expected from our model.

first consequence of the model is that the length of Α the fibre must be close to 270 Å to account for the banding pattern. A second consequence is in the stoichiometry of the fibre. The density of the crystals was measured in a 40-60% (W/W) aqueous density gradient of Ficoll 400 (Pharmacia, Sweden) and also by floatation in Xylene/Carbon Tetrachloride The Ficoll molecules are very large and mixtures. cannot diffuse into crystals (Westbrook, 1976). Sample densities were measured by weighing. In this way the crystal density determined as  $1.221\pm0.005$  gxcm<sup>-3</sup>. The measurement in was Xylene/Carbon Tetrachloride gave a density of  $1.24 \pm 0.01$  $gxcm^{-3}$ . Assuming a protein specific volume of  $\emptyset.703$  cm<sup>3</sup>xg<sup>-1</sup> (Devaux et al. 1981), a monomer molecular weight of 62000 and average density of 1.23 from the above measurements an 100 calculate the number of monomers per unit cell to be 22.8. The space group and packing model allow only 12 molecules of fibre per unit cell : thus the adenovirus fibre must be a This result is the first clear determination of the dimer. stoichiometry of the fibre and supports strongly the preferred model of Green et al. (1983) who have predicted from the amino acid sequence a structure for the fibre monomers and who propose from this that its most likely mode of aggregation is into a dimer although they cannot rule out a trimeric molecule. A trimer was indeed previouly suggested by Boulanger and Devaux (1983) on the basis of the mobility of fluorescamine modified fibre in a gel. Our new finding shows that this method also leads to an overestimate of the molecular weight for elongated proteins. We must note that our determination relies on the correct assignement of the space group. With an orthorhombic space group of the nature discussed above the conclusion would be that the fibre is a trimer. Although the E.M. pictures makes such a space group very unlikely, to rule out definitely this hypothesis we must wait for X-ray single crystal data.

Previous studies (Devaux et al. 1982) had shown that the penton base is a trimer posing the problem of how such a molecule could be located at a position of five-fold symmetry. We are now faced with a further problem of symmetry mismatch in understanding how a dimeric fibre can bind to a trimeric penton base. These questions can only be fully adressed when crystals large enough to permit a high resolution structure determination are available.

We thank Dr. Elisabeth Hewat for help with the image reconstructions of electron micrographs, Didier Petite for producing cells and Joseph Sedita for his expertise in producing Fig.4.

We are also grateful to Dr. Vivian Mautner for extensive discussions concerning her earlier work on crystals of type 5 fibres.

## References

- BOULANGER, P. and DEVAUX, C. (1983)

Biochem. Biophys. Res. Commun.110, 913-918

- BOULANGER, P. and PUVION, F. (1973) Eur. J. Biochem. 39, 37-42

- DEVAUX, C., ZULAUF, M., BOULANGER, P. and JACROT, B. (1982)

J. Mol. Biol. 156, 927-939

- GREEN, N.M., WRIGLEY, N.G., RUSSELL, W.C., MARTIN, S.R.and McLACHLAN, A.D. (1983)

EMBO J. 8, 1357-1365

- HENNACHE, B. and BOULANGER, P. (1977) Biochem. J. 166, 237-246

- HERISSE, J., RIGOLET, M., DUPONT de DINECHIN, S. and GALIBERT, F. (1981)

Nucl. Acids Res. 9, 4023-4042

- HORNE, R.W., BRENNER, S., WATERSON, A.P. and WILDY, P. (1959)

J. Mol. Biol. 1, 84-86

- ISHIBACHI, M. and MAIZEL, J.V. (1974) Virology, 58, 345-361

- MAC PHERSON, A. Jr. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6300-6303

- MAUTNER, V. and PEREIRA, H.G. (1971)

Nature, 230, 456-457

- NORRBY, E. (1969)

J. Gen. Virol. <u>5</u>, 221-236

- PETTERSSON, U., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S. (1968) Virology, 35, 204-215
- PHILIPSON, L., LONGBERG-HOLM, K. and PETTERSSON, U. (1968) J. Virol. 2, 106-1075

- SAXTON, W.O., PITT, T.J. and HORNER, M. (1979) Ultramicroscopy <u>4</u>, 343-354

- SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., THELANDER, L. and PHILIPSON, L. (1973)

Virology 51, 252-256

- VALENTINE, R.C. and PEREIRA, H.G. (1965) J. Mol. Biol. 13, 13-20

- WESTBROOK, E.M. (1976) J. Mol. Biol. 103, 659-664

#### Legend of figures

Figure 1

Electron micrograph and optical diffraction pattern of a crystal of adenovirus type 2 fibre. A crystal was gently crushed in a Potter homogeneizer, deposited on a carbon coated grid and negatively stained with 1% uranyl acetate (pH=4.4). Grids were examined in a Jeol 100 CX electron microscope operated at 80KV.

(a) The electron micrograph shows a structure of four strong bands of total width about 200 Å repeating every 580 Å. This repeat distance is somewhat variable (500-580 Å) but in all cases the 200 Å wide four-banded unit is conserved. Two light bands 150 Å away from the strong bands can also be seen. The insert shows a repeat of 38 Å perpendicular to the 580 A periodicity which is often observed.

(b) Optical diffraction pattern corresponding to (a). Several orders of the 580 Å repeat parallel to the fibre axis can be observed.

(c) and (d) Model for longitudinal packing of fibre molecules consistent with the banding observed in (a).

### Figure 2

(a) Electron micrograph showing another view of the crystal.The preparation of the grids is similar to that used inFigure 1. Micrographs were scanned on an Optronics (P 1000)

rotating drum densitometer coupled to a Nord-10 computer. The hest ordered areas were extracted and Fourier image filtering was performed using the Semper-V system (Saxton et al., 1979).

(b) Fourier Transform of an area of 6400 x 6400  $\mu$ m

(c) Inverse Fourier Transform after filtering. The distance between points A and B corresponds to 76  $\frac{2}{4}$ .

#### Figure 3

X-ray powder diffraction pattern of adenovirus type 2 fibre. Crystals were mounted in X-ray glass capillaries (Lindemann, Ø.5 mm). The X-ray source was an Elliot GX 13 rotating anode tube with electron beam size 100 m x 1 mm on the anode. Scattering patterns were recorded on film (CEA Verken) using a double focussing system consisting of a Franks mirror and a quartz monochromator with cut angles of 00 and 80 respectively. Specimen to film distances were 100 mm (a) or 1000 mm (b) allowing observation in the range s = (10-3 - 0.3) A1. Intensities were integrated along circles, the center of the pattern being determined using the diffraction peaks. The scattering curves obtained are shown 3c and 3d. The intensities of the diffraction peaks were in obtained by integration of the peaks after substraction of the polynomial fitted background. All the peaks may be indexed on a hexagonal lattice with a=b=77 A,  $\alpha = \beta = 90^{\circ}$ , c=590 A, X=1200. Due to the very long c axis the 001 reflections are well separated from the hkØ reflections The lowest angle film (3c) shows the first nine  $\emptyset \emptyset \mathcal{L}$  orders before the (100). At higher angles (3d) the reflections are predominantly of

the hk0 type although general hkl reflections may also be present but not resolved. Thus the indices are given either as the  $\mathbf{L}^{\text{th}}$  (00**L**; 3c) or h,k (3d). The 001, 002 and 003 reflections were measured with a shorter exposure.

#### Figure 4

A model for packing of fibre molecules in the hexagonal unit cell. Shows a three dimensional packing of the molecules which satisfies the major features of the E.M. and X-ray scattering data. The planes of tightly packed heads (1 to 4) correspond to the four strong bands observed in the E.M. (Fig.1) and are drawn to scale assuming a spherical head of diameter 38 Å. The cylindrical tails are shown thinner than in reality for ease of visualization. The packing of heads within each plane is shown in A, B and C.Other models, all based on the packing of heads shown in A, B and C are discussed in the text.

# I. INTRODUCTION

Les résultats présentés au chapitre précédent concernent le poids moléculaire et la stoechiométrie d'une protéine, le penton (base du penton + fibre), située à l'apex de l'adénovirus. Dans un même temps, nous avons entrepris une étude à basse résolution de la structure globale du virion: organisation des protéines dans la capside, et du DNA et des protéines dans le nucléoïde.

Il est bien établi par microscopie électronique que l'adénovirus est un icosaèdre formé d'hexons sur les faces et de pentons aux sommets. Les autres protéines sont localisées plus approximativement dans la nucléocapside par des méthodes indirectes, et les interactions existant dans la particule sont peu connues. Néanmoins plusieurs modèles ont pu être proposés à partir des données de la microscopie électronique et de la biochimie.

Dans cette seconde partie, nous présentons les résultats de l'étude de l'adénovirus de type 2 et de ses principales sous-structures( les groupes de 9 hexons et les nucléoïdes ) et d'un mutant,le H<sub>2</sub>ts112, accumulant des particules intermédiaires d'assemblage,par la diffusion de neutrons et de rayons X . Un modèle structural à basse résolution est proposé pour le virus ; il sera comparé aux modèles déj à existants.

II. DIFFUSION DE NEUTRONS A PETITS ANGLES : DETERMINATION DU POIDS MOLECULAIRE

1. Les échantillons

Il est essentiel, surtout pour les mesures à patits angles, que les échantillons soient homogènes (solutions de protéines ou de virus) et dépourvus d'agrégats ou de produits de dégradation.





(x145000)

(x128000)

Figure 18

En microscopie électronique, les particules  $(1,29-1,31 \text{ g/cm}^3)$ du mutant H<sub>2</sub>ts 112 (a) apparaissent plus arrondies que les particules  $(1,34 \text{ g/cm}^3)$  du virus mature (b). Des zones plus sombres montrent que le colorant peut pénétrer dans les particules. Des trous sont parfois visibles dans la capside. Ces particules ont été caracterisées par D'Halluin et al. (1978b; voir Généralités I paragraphe IV,5a et tableau 14).

Les particules virales sont préparées suivant la technique de Boulanger et Puvion (1973) à partir de cultures de cellules KB infectées poussant en suspension. Ces cultures sont maintenues à 37°C durant 36-40h pour la production du virus de type sauvage, et à 39,5°C durant 24h (température non permissive) pour la production du mutant bloqué au stade d'intermédiaire. Les cellules infectées sont soumises à 3 cycles de congélation-décongélation, puis les particules virales sont extraites par le Fréon 113 (Trifluoroéthane) et purifiées en gradient de densité (chlorure de césium). Le virus est isolé à sa densité de 1.34 g/cm<sup>3</sup> et le mutant à la densité des intermédiaires légers, 1.29-1.31 g/cm<sup>3</sup> (D'Halluin et al., 1978a, b). L'état de purification et l'homogénéité des échantillons sont contrôlés en microscopie électronique et en gel de polyacrylamide-SDS (figure 18). De plus, nous avons déterminé la composition en acides aminés du mutant H<sub>2</sub>ts 112 (tableau 13 ).Elle montre une diminution de l'arginine de 30 % et de l'alanine de 15 %, ce qui est normal en l'absence des protéines VII et µ (riches en ces acides aminés). L'ensemble des résultats obtenus est en accord avec la caractérisation des particules du mutant Hots 112 publiée par D'Halluin et al., 1978b.

# 2. Méthode de mesure.

Par diffusion de neutrons, les préparations virales sont effectuées immédiatement avant les expériences, et dialysées contre un tampon tris-HCl 5 mM, 200 mM NaCl, pH 8.1. Les concentrations sont relativement faibles: 0.350 à 0.750 mg/ml pour le virus, 1.5 mg/ml pour le mutant. Les solutions de concentrations plus élevées ont tendance à précipiter.

Le poids moléculaire est mesuré à petits angles par diffusion de neutrons . Il est déduit de la mesure de Io obtenue en extrapolant la courbe Ln I(q) en fonction de q (voir article 4 : data analysis ).Le point critique est toujours la détermination précise de la concentration. Elle a été déduite de la mesure de l'absorbance et du coefficient d'extinction moléculaire.

	Ad	2	H <sub>2</sub> ts112
<u></u>	(1)	(2)	(2)
Lys	4.4	4.3	4.2
His	1.6	1.7	1.6
Arg	7 + 9	8.2	5*6
Asp	11.2	12.4	13•4
Thr	б. 9	7 • 1	б.5
Ser	6.7	7•2	7+2
Glu	9•0	8.7	10+1
Pro	7+2	5*6	6.9
Gly	7.8	7+5	6 * 8
Ala	9•0	11.4	8.4
Val	6 • 1	6 * 6	6.2
Met	2•3	2*2	0 + 8
Ile	3.4	3.5	4.1
Leu	7+4	7•9	8 • 8
Tyr	4,4	4.6	4 • 3
Phe	3.8	3•7	4.1
Trp	1.2	N * D *	N • D •
1/2Cys	0 • 3	0 • 4	N•D

#### TABLEAU 13 -

Composition en acides aminés du virus de type sauvage (Ad<sub>2</sub>) et du mutant H<sub>2</sub>ts112. (1) d'après Polasa et Green (1967)

- (2) nos résultats (moyennes de 6 analyses).

a. mesure de l'absorbance.

Le virus présente un maximum d'absorption à 258 nm caractéristique de la présence de DNA. Les solutions virales sont opalescentes et il est nécessaire de corriger la mesure de la densité optique (D.O.) par rapport à la diffusion. Le Ln D.O. en fonction du Ln  $\lambda$  (longueur d'onde) entre 500 et 300 nm est une droite. En extrapolant cette droite on obtient la mesure de la diffusion à 258 nm (voir figure 19). Le rapport 258/278 est de 1.17 pour le virus qui contient 13.3% de DNA (Green et Pina, 1964) et de 0.84 pour le mutant qui contient 2 à 5% de DNA. Le rapport est de 0.58 pour une protéine comme l'hexon.

b. mesure du coefficient d'extinction moléculaire.

La concentration est calculée d'après l'analyse quantitative des acides aminés d'un aliquot de volume connu d'une solution de virus ou de mutant en présence d'un témoin interne, la norleucine. Le protocole est identique à celui utilisé pour les solutions de protéines. L'analyse est corrigée pour le contenu en tryptophane détruit lors de l'hydrolyse, et pour le contenu en DNA viral. Les coefficients d'extinction moléculaire ( $\mathcal{E}$ ) sont calculés d'après la loi de Beer-Lambert.

# 3. détermination du poids moléculaire.

Le tableau suivant présente les coefficients d'extintion déterminés par analyses d'acides aminés et les poids moléculaires calculés à partir de <u>Lo</u>.

		<u> </u>	
	٤ <sup>1°/</sup> °° <sub>258</sub> °	٤ <sup>1°/</sup> °°	PM x 10 <sup>6</sup>
Ad <sub>2</sub> type sauvage <sup>H</sup> 2ts 112	4*95 2*02	- 2•40	185 ± 20 127 ± 25



Spectres d absorption entre 500 et 230 nm du virus (a) et du mutant (b). Encart: Droites représentant le Ln D.O. en fonction du Ln  $\lambda$  et permettant de corriger la valeur de l'absorbance.

, . .

masse moléculaire du virus calculée à La partir du déterminé par analyses d'acides aminés est de 185 + 20 x 10<sup>6</sup>. Elle n'est que de  $134 \times 10^6$  si la concentration utilisée est celle établie par dosage de Lowry. Le tableau 14 donne la masse moléculaire totale de chaque polypeptide dans un virus. Cette masse est calculée à partir du PM du polypeptide et de son nombre de copies par particule (ces renseignements viennent soit de nos résultats, soit des données de la littérature et seront discutés par la suite). Ce tableau permet de calculer un poids moléculaire théorique pour le virus de 157-162 x 10<sup>6</sup>: ce qui exclut le poids moléculaire trouvé en utilisant la concentration déterminée par la méthode de Lowry. Green et al. (1967) obtiennent un PM de 183,5 x  $10^6$  à partir de la mesure de longueur du DNA (PM = 24 x  $10^6$ ), et un pM de 172,9 x  $10^6$  à partir du coefficient de sédimentation du DNA (PM =  $23 \times 10^6$ ). Ces deux techniques supposent un contenu en DNA de 13.3% (Green et Pina, 1964).

Nous aboutissons, pour la masse moléculaire du virus mature, à une valeur plus élevée (185 x  $10^6$ ) que celle calculée à partir du tableau 14 (157-162 x  $10^6$ ). Plusieurs remarques peuvent être formulées sur la fiabilité des données de ce tableau:

- a. le PM calculé conduit à un pourcentage de DNA dans le virion de 14,2-15,3, alors que Green et Pina (1964) mesurent un pourcentage de 13,3 à partir de dosages de Lowry, d'azote (protéines), de phosphore (DNA) et du poids sec (virus complet). On constate donc une incertitude sur le pourcentage de DNA dans le virus;
- b. le nombre de copies du polypeptide II (hexon) est sans ambiguité, et nous avons déterminé avec précision la stoechiométrie de la base du penton et de la fibre dans la première partie de ces travaux;
- c. la stoechiométrie des autres polypeptides provient des études suivantes:
  - Boudin et al. (1980) trouvent 60 copies de IIIa par virion, soit 5 par apex, par deux méthodes indépendantes: enregistrement de gel-SDS et immunoélectrophorèse quantitative (les échantillons sont marqués à la valine <sup>14</sup>C).Par enregistrement de gel coloré au bleu de Coumassie nous avons trouvé 9 copies de IIIa



# Tableau 14

Composition chimique du virus et du mutant.

- (a) les poids moléculaires des polypeptides II, IV, VII et IX sont donnés d'après leur séquence, les autres sont les poids moléculaires apparents déterminés sur gel de polyacrylamide-SDS.
- (b) nombre de copies par virion (discussion au paragraphe III2)
- (c) et (f) masse moléculaire totale de chaque polypeptide par virion et par mutant respectivement.
- valeur peut varier suivant le composition en acides aminés et le  $ar{v})$ . Le pouvoir diffusant moyen du DNA est: calculée en utilisant le pouvoir diffusant moyen d'une protéine:  $\frac{\mathcal{E}b - \rho s V}{w} = 2,95 \times 10^{-14} \text{cm/unité de PM}$  (cette (d) et (g) masse diffusante théorique correspondant à la masse de chaque polypeptide dans le virus. Elle est W  $\frac{\sum b - psv}{2} = 3,67x10^{-14} cm/unité de PM.$
- Nos enregistrements de gels colorés ne montrent pas de différence significative entre le nombre de copies (e) nombre de copies par mutant: la composition en polypeptides est celle décrite par D'Halluin et al., 1978. de polypeptides existants à la fois dans le virus et dans le mutant, ni entre pIIIa, pVII, pVIII et IIIa, VI et VIII respectivement.

			Virus			Mytant H <sub>2</sub> ts112	
	MC	nombre de	masse moléculaire	masse	nombre de	masse moléculaire	masse
1	ғм polypeptide	copies par virus	totale par virus <sub>x10</sub> 6	diffusante <sub>x10<sup>-8</sup></sub>	copies par mutant	totale par mutant x10 <sup>6</sup>	diffusante x10 <sup>20</sup>
	(a)	(q)	(c)	(q)	(e)	(£)	(g)
	100113	040*5	77,8	229,5	iđ	77,8	229,5
II	0001	3x12	3,1	9,1	iđ	3,1	9,1
TTT	00068		. 0	0	id IIIa	4,0	11,8
TIIA	66000	5-10x12	4-8	11,8-23,6	0	0	0
DTTT	62000	2 <b>x</b> 12	1,5	4,4	iđ	1,5	4,4
2 E/11	56000	~			<b>٠</b> •		
1 V 4 2 2 5 V	55000	5	0,1	0,3	0	0	0
AUS	50000	0		0	127	6,3	18,6
	48500	180	8,7	25,7	0	0	0
		0	0	0	12	0,5	1,5
5.4K		0	0	0	id VI,VIII	11,7	34,7
T AC		0	0	0		6,2	18,3
		420	10,1	29,8	0	0	0
۲. ۲.	21000	G	0	0	0	0	0
TTA	1900	1070	20,3	59,9	0	0	0
1111	13000	240?	3,1	9,2	0	0	0
1777 X T	14500	300	4,4	13,0	id	4,4	12,8
11A-1A A	0	۰.			<b>C</b> •		
TTV-TV-V	4000-6000	125	0,6	1,8	¢.		
Total		C					
protéines		us	134-138	394,5-406,3		د <b>،</b> داا ۲	340,775
DNA	į		23-24	84,4-88		3,8-0,4	C 162-6161
Total Virve			157-162	478,9-494,	~	771-611	1000-00 ACC

de Coumassie nous avons trouvé 9 copies de IIIa par apex ,mais cette valeur est très incertaine dans la mesure où aucune correction n'avait pu être faite (voir chapitre précédent);

- Boulanger et al. (1979) calculent 288 copies de polypeptides IX par virion et 14 par groupe de 9, par enregistrement de gel-SDS (échantillons marqués Val<sup>14</sup>C);
- Everitt et al. (1973) dosent les polypeptides VI, V et VII dans le virus après élution de gels préparatifs;
- aucune valeur n'est rapportée pour le polypeptide VIII.
  Everitt et al. (1975) démontrent qu'il est ponté avec tous les hexons de la capside. On peut donc supposer qu'il existe un minimum de 240 copies de VIII.

La masse de protéines calculée à partir de ces données est donc de 134-138 x 10<sup>6</sup>. Ce chiffre pourrait être, en fait, légèrement plus grand car les polypeptides IVa<sub>2</sub> et X-XI-XII (probablement des produits de dégradation de pVI, pVII, pVIII) n'ont pas été comptabilisés. De plus, la plupart des mesures proviennent d'enregistrements de gels-SDS ou de dosages d'éluats de gels préparatifs et ces techniques peuvent conduire à des imprécisions.

Le poids moléculaire du mutant  $H_2ts112$  déterminé dans les mêmes conditions que celui du virus est de 127 x 10<sup>6</sup>, ce qui est cohérent avec l'absence des protéines VII ( 1070 copies), des protéines V ( 180 copies) et d'une grande partie du DNA. La présence des protéines 39K et 50K (environ 12 et 127 copies respectivement, observation personnelle) ne peut pas compenser une perte de masse 40 x 10<sup>6</sup> environ (tableau 14).

Les valeurs trouvées pour les PM du virus et du mutant sont moins précises que celles déterminées pour les protéines. Ceci est essentiellement dû à la difficulté de déterminer la concentration des solutions virales. En revanche, les incertitudes sur le pourcentage de DNA n'affectent pas de façon sensible cette détermination, car bien que les pouvoirs diffusant des protéines et du DNA ne soient pas identiques, une différence du contenu en DNA de 1% ne modifie le PM que de 0.25%.

## III. DIFFUSION DE NEUTRONS: VARIATION DE CONTRASTE ET MODELES

Les particules virales sont dialysées dans des tampons Tris-HCl 5 mM, NaCl 200 mM, pH 8.1 contenant 0, 25, 40, 55, 65, et 100%  $D_20$  et soumises à un faisceau de neutrons à des distances échantillon-détecteur de 10,66 m et 4,84 m.

1. Modèle sphérique et icosaédrique à 3 couches (virus mature).

Un modèle sphérique à trois couches est ajusté aux données obtenues à chaque contraste  $H_2O/D_2O$  (le principe de construction est donné au chapitre des techniques II<sub>1et2</sub> et les détails pour le modèle de l'adénovirus se trouvent dans l'article 4). Chaque couche est définie par son rayon extérieur et par sa densité de diffusion . Le tableau 15 donne les paramètres du modèle. Nous savons que tout le DNA est localisé dans le nucléoïde, or la variation de contraste nous montre que seule la couche I contient du DNA (le point d'annulation pour des protéines étant environ 0,40-0,42). Connaissant la masse moléculaire du virus (185 x 10<sup>6</sup>), le contenu en DNA, protéines et eau est déterminé dans chaque couche du modèle (tableau dans l'article 4). De plus, nous discutons dans cet article la possibilité de construire un modèle icosaédrique à partir de ce modèle sphérique.

2. Interprétation du modèle.

En utilisant nos récents résultats et les données de la littérature, nous allons reconsidérer la composition chimique du virus en termes de quantité de matière diffusante: la masse diffusante trouvée expérimentalement dans chaque couche est comparée à la masse diffusante théorique calculée pour chaque protéine et pour le DNA (tableaux 14 et 15).

Couche	Volume $\times 10^{603}$ $\checkmark$ .	densité diffusante (a) $\rho \times 10^{-14} \text{ cm}^{30-3}$	masse diffusante م ۷	point d'annulation	composition chimique
I 0-303Å	116,5	1,48	178,4	0,55	DNA + Protéine
II 303-348Å	59,5	1,76	104,7	0,43	Protéine
III 348-420Å	127,0	2,19	278,1	0,42	Protéine
		B. Mut	ant H <sub>2</sub> ts112		
Couche	V	p	v g	(b	)
I-II 0-348	176,0	0,54	95,0		
III 348-420	127,0	2,25	285,8		

A. Virus

## Tableau 15

Paramètres de chaque couche du modèle neutronique pour le virus et le mutant  $H_2$ ts112.

(a) les densités sont mesurées à 0%  $\mathrm{D}_2\mathrm{O}$  et données en valeur absolue.

(b) la variation de contraste n'a pas été réalisé pour le mutant.



La couche centrale du modèle (I) de diamètre 606 Å, est la seule à contenir du DNA. Son point d'annulation est 0,55. Il est donc logique de comparer cette couche I avec le nucléoïde viral qui contient une molécule de DNA double brin circularisée par 2 molécules de protéines 55K et associée aux protéines V, VII et $\mu$ . Le tableau 14 permet de calculer un pouvoir diffusant théorique d'environ 175 x 10<sup>-8</sup> cm pour cette composition du nucléoïde, alors que le tableau 15 donne un pouvoir diffusant expérimental de 178 x 10<sup>-8</sup> cm pour la couche I. On peut donc supposer que la couche I du modèle représente le nucléoïde.

Les deux couches extérieures (420-348 et 348-303 Å) ont épaisseur totale de 117 Å. La hauteur de l'hexon étant une d'environ 110 Å (Berger et al., 1978; Nermut, 1979), i1 semble que ces deux couches représentent la capside virale, constituée uniquement de protéines. Nous avons vu au chapitre des généralités qu'au moins sept protéines interviennent dans la composition de la capside. Le pouvoir diffusant théorique de ces protéines (II, III, IIIa, IV, VI, VIII et IX) est de  $303 \times 10^{-8}$  cm. Cependant l'ensemble de la masse diffusante expérimentale des couches II et III est de 359 x  $10^{-8}$  cm: un 18% de masse diffusante est donc excès de détecté expérimentalement. Cet écart peut être en partie expliqué par la différence de poids moléculaire du virus, mesuré (185 x  $10^6$ ) et calculé (157-162 x  $10^6$ ). En fait, plusieurs types d'erreur peuvent intervenir: soit lors des mesures de diffusion de neutrons, soit dans la détermination du poids moléculaire et du nombre de copies de chaque polypeptide.

La répartition de ces 7 protéines entre les couches II III du modèle n'est pas entièrement résolue. La fibre et et protéine IIIa sont localisées dans la couche la plus la L'hexon et la base du penton, de part extérieure. leur 80-90 Å (Valentine et Pereira, hauteur 110 Å et 1965, microscopie électronique) sont repartis entre les 2 couchés. et III. La couche III a une épaisseur de Å et 72 un II pouvoir diffusant total de  $255 \times 10^{-8} \text{cm}$ La fraction diffusante théorique venant de l'hexon présent dans la couche extérieure (en supposant sa densité homogène, ce qui n'est pas le cas) est approximativement de  $\frac{229,5x72}{110}$  et celle venant du penton de  $\frac{9,1x72}{90}$ . Si l'on ajoute les pouvoirs diffusants



## Figure 20

Ajustement d'un modèle sphérique à l'intensité I(q) diffusée par le mutant H<sub>2</sub>ts112 dans 0% D<sub>2</sub>0.

(+++) valeurs experimentales ;

BUS

(\_\_\_) valeurs des intensités calculéesà partir d'un modèle à 2 couches.

calculés pour la IIIa et la fibre, la masse diffusante pour la couche III doit être alors au minimum de 162x10<sup>-8</sup>cm.

La couche II a une épaisseur de  $45\text{\AA}$  et un pouvoir diffusant de  $104.7 \times 10^{-8}$  cm. Elle contient au minimum les fractions restantes d'hexon et de penton soit un pouvoir diffusant théorique de 76,6x10<sup>-8</sup> cm environ.

Il reste à compléter la composition de ces 2 couches en localisant les protéines VI et VIII qui ont été caracterisées comme des protéines internes par Everitt et al. (1975) (voir modèle, figure 3 dans les généralités), et la protéine IX située entre les hexons des groupes de 9 (Boulanger et al., 1979). Le pouvoir diffusant de ces trois protéines est de  $47.5 \times 10^{-8}$  cm.

Nous pouvons formuler deux hypothèses pour expliquer la forte densité de diffusion de la couche la plus extérieure de la capside:

- une ou plusieurs (ou de grandes parties) des protéines
  VI, VIII et IX seraient situées dans cette couche,
  peut-être entre les hexons, ce qui expliquerait
  leur manque de réactivité (Everitt et al. 1975);
- l'hexon aurait sa partie la plus dense dirigée vers l'extérieur. Rappelons qu'il posséde une extrémité triangulaire et une extrémité hexagonale (voir modèle, figure 4), cette dernière étant la plus dense (Burnett, communication personnelle).

Il est actuellement difficile d'adopter l'une ou l'autre de ces hypothèses avant d'avoir réalisé de nouvelles expériences.

# 3. Résultats préliminaires pour le mutant H<sub>2</sub>ts 112

Les particules du mutant  $H_2$ ts 112 n'ont pas encore été étudiées par variation de contraste. Néanmoins, la courbe de diffusion obtenue à 0%  $D_2$ 0 montre nettement deux maxima subsidiaires, et peut être comparée à celle du virus de type sauvage. Il est possible d'ajuster un modèle sphérique aux données de la diffusion du mutant. Un bon ajustement (figure 20) est obtenu pour un modèle à 2 couches sphériques de rayons extérieurs 420 et 348 Å. L'insuffisance des données et surtout l'absence de variation de contraste ne permet pas d'affiner le modèle en introduisant une troisième couche. Le tableau 15 donne les paramètres des deux couches.

La couche extérieure (420-348 Å) a les mêmes rayons et la même densité que la couche III du virus mature (aux erreurs de mesure près). La forte densité dans la partie extérieure de la capside (10% d'eau seulement) est confirmée ici. Les protéines présentes dans la couche extérieure du virus doivent donc toutes l'être dans la couche équivalente du mutant.

La partie centrale (diamètre 796 Å) présente au contraire une densité fortement diminuée: son pouvoir diffusant passe de 283,1x10<sup>-8</sup> cm (couche I et II du virus mature) à  $95x10^{-8}$  cm (mutant). Le mutant H<sub>2</sub>ts112 ne contient que 3 à 5% de DNA (au lieu de 13.3%) et ne possède pas les protéines internes V et VII, soit une perte de pouvoir diffusant de 150 à  $160x10^{-8}$  cm.

Il faudra attendre des données plus complètes, en particulier de l'étude du mutant par variation de contraste, pour avoir une meilleure répartition des pouvoirs de diffusion des protéines et du DNA dans cette particule incomplète.

## IV. DIFFUSION DE RAYONS X

# 1. Les échantillons

Les solutions virales utilisées pour les mesures par diffusion de neutrons peuvent servir pour la diffusion de rayons X à condition de les concentrer. Environ 1  $\mu$ l de suspension à la concentration de 100-400 mg/ml est nécessaire. Un précipité ou un culot de centrifugation peuvent également être utilisés. Les solutions très diluées sont le plus souvent concentrées par dialyse sous vide (système Prodicon) une nuit à un volume de 200  $\mu$  l. Eventuellement, cette fraction peut encore être concentrée par centrifugation (90000 rpm, 1-5 mn; Centrifugeuse Airfuge, Beckman). Le gel obtenu est transféré dans des capillaires de 0.5 mm de diamètre (Lindemann).

Quatre types de structures ont été étudiées par diffusion de rayons X:

le virus mature

le mutant d'assemblage  $H_2$ ts 112.

les groupes de 9 hexons et les nucléoïdes: les sous-structures du virus obtenues par dégradation douce de la nucléocapside (DOC, 56°C, 90s)

L'objet de ces études est de découvrir les organisations structurales du virus intervenant dans les diagrammes de diffusion.

# 2. Diagrammes de diffusion de rayons X.

Les mesures sont effectuées à deux distances échantillon-film: 100 cm  $(6 \times 10^{-3} \le q \le 6 \times 10^{-2} A^{\circ-1},$  petits angles) et 10 cm  $(6 \times 10^{-2} \le q \le 2 A^{\circ-1},$  moyens angles).

a. Le virus.

Dans l'article 4, nous avons montré que le diagramme de diffusion de rayons X par le virus aux plus petits angles est semblable à celui observé par diffusion de neutrons, et du à la diffusion d'un objet quasi-sphérique. Aux plus grands angles apparaît une série de maxima et minima que nous considérons comme venant de l'arrangement des hexons dans la capside (tableau 16 et article 4).

Théorie	Virus	H <sub>2</sub> ts112
79+5	79•5	81.4
66•1	64.8	67 • 2
	57.6	60.6
48.3	45.5	48.2
41.6	41.1	41.8
31.7	31#7	32•6
28+3	27 • 3	28.1
23*5	23•7	23+3
21•3	21.7	21.9

## TABLEAU 16

Comparaison de la valeur des maxima (en Å) observés par diffusion de rayons X (distance échantillon-film: 10 cm) pour le virus et le mutant  $H_2$ ts112,avec les maxima calculés (calcul de Debye) pour la diffusion de 252 point répartis sur la surface d'un icosaèdre T=25.Le meilleur accord entre les valeurs théoriques et expérimentales est obtenu pour une distance entre les points de 100 Å. (S.CUSACK a effectué ce calcul). b. Les Nucléoïdes.

Pour continuer l'interprétation du diagramme de diffusion de rayons X, les nucléoïdes ont été étudiés après dissociation des virus au DOC. Ils sont purifiés en gradient glycérol (Boulanger et al., 1978), fixés par 1% de de glutaraldéhyde pour minimiser leur déformation et soumis au faisceau de rayons X (film à 10 cm de l'échantillon). Le diagramme de diffusion montre un large maximum dont le centre est à environ 29 Å (figure 21). En reconsidérant le diagramme du virus, il est possible de voir un maximum diffus, superposé aux maxima à 31,7 et 27,3 Å et venant de la structure de la capside. Au contraire, le diagramme du mutant H<sub>2</sub>ts112 (figure 21) et ceux des différentes préparations de groupes de 9 hexons, présentent un minimum entre les deux pics à  $\sim$  32 et 28 Å. Il semble donc que le maximum à 29 Å soit caractéristique de la structure du nucléoïde.

c. Les échantillons colorés par le chlorure de mercure.

Afin de connaître l'origine de ce maximum à 29 Å, nous avons étudié la fixation des ions mercuriques (Hg<sup>++</sup>) sur le virus et les nucléoïdes. Ces ions sont connus pour former des complexes avec les acides nucléiques (Thomas, 1954). La fixation des ions Hg<sup>++</sup> est suivie par spectroscopie, et la diffusion des échantillons colorés est étudiée aux rayons X dans les mêmes conditions que les échantillons natifs. Les particules colorées sont vérifiées en microscopie électronique: aucune dégradation n'apparaît.

- Diffusion de rayons X.

La figure 7 de l'article 4 compare les clichés de diffusion (A) du virus natif et coloré par le chlorure de mercure 0.1% à ceux (B) des nucléoïdes natifs et colorés. Les clichés des échantillons colorés présentent des anneaux de



Figure 21

BUS

Diagrammes de diffusion de rayons X : (a)du virus mature (\_\_\_\_) et du mutant H<sub>2</sub>ts112 (---) (b) du nucléoïde. diffusion plus flous que ceux des échantillons natifs.Seule l'intensité de l'anneau à 29 Å est fortement augmentée.

- Spectres d'absorption.

ions mercuriques sont ajoutés à des solutions Les diluées de virus, nucléoïdes et groupes de 9 hexons. La figure 22 montre l'évolution des spectres d'absorption de 500 à 230 nm avec l'addition de Hg<sup>++</sup>. Des comparaisons sont effectuées avec les spectres obtenus pour des solutions de DNA seul et de protéines (hexon purifié). Un déplacement du maximum d'absorption du DNA (figure 22c) de 258 à 272 nm est observé comme prévu (Thomas, 1954; Yamane et Davidson, 1961). Le même déplacement est retrouvé pour les spectres des nucléoïdes et du virus (figure 22a et b). Le maximum d'absorption (278 nm) des groupes de 9 hexons et des hexons purifiés demeure inchangé, mais l'addition d'ions mercuriques induit rapidement leur agrégation. En effet,les ions Hg<sup>++</sup> pouvant se fixer sur les radicaux -SH libres (Pfeiffer et Dorne, 1971), il n'est pas exclu qu'une petite partie se soit fixée sur les protéines virales si des -SH sont exposés à leur surface (il y a 3 ponts disulfure Cys-S-S-Cys et un seul libre dans l'hexon isolé, Jörnvall et al., 1974). -SH Les diagrammes de diffusion du virus et du nucléoïde en présence Hg<sup>++</sup> présentent un renforcement du maximum à 29 Å, de les autres maxima ainsi que le diagramme des groupes de 9 sont inchangés. La variation du maximum d'absorption du spectre du nucléoïde, avec l'addition de Hg<sup>++</sup> et le renforcement du pic à 29 Å, nous fait conclure à la présence d'une structure très organisée au niveau du DNA du nucléoïde.

d. Le mutant H<sub>2</sub>ts112.

Le diagramme de diffusion du mutant d'assemblage H<sub>2</sub>ts112 est comparé à celui du virus (figure 21, tableau 16). Le mutant ne possède pas de structure en nucléoïde (absence de protéines V et VII et d'une grande partie du DNA).



BILS

Figure 22

Déplacement du maximum d'absorption des échantillons de 258 vers 272 nm en fonction des quantités (en µg) d'ions mercuriques ajoutées. a. virus (115 µg soit 15 µg de DNA) b. nucléoïde (19 µg soit 9 µg de DNA) c. DNA seul (50 µg). Le tableau 16 montre que la série des maxima, interpretée comme venant de l'arrangement des hexons dans la capside, est retrouvée chez le mutant. La figure 21 indique une forte diminution de l'intensité de la courbe de diffusion du mutant dans la région 30-26Å. Les deux pics à 32Å et 23Å (dus à la diffusion des hexons de la capside) sont aussi présents chez le mutant, mais un minimum est nettement visible à 29-30Å révélant l'absence du large maximum à 29Å. De plus, le diagramme de diffusion est inchangé quand le mutant est coloré par Hg<sup>++</sup>.

Nous avons donc mis en évidence un maximum à 29Å caractéristique de l'organisation interne du virus.

#### e. les groupes de 9 hexons.

Le diagramme de diffusion du virus à moyens angles  $(6x10^{-2} \leqslant q \leqslant 2\text{\AA}^{-1})$  a été interprété comme essentiellement du à la disposition des hexons dans la capside (excepté le maximum à 29 Å). Il semblait intéressant de poursuivre ce travail par l'étude des groupes de 9 hexons qui représentent les 20 faces triangulaires de l'icosaèdre viral et d'observer les réassociations possibles.

Les groupes de 9 hexons sont purifiés en gradient de glycérol 10-40% (Boulanger et al., 1978) après dégradation du virus au DOC, et dialysés contre un tampon 100 mM phosphate de sodium pH 6,2 (Pereira et Wrigley, 1974).

Les diagrammes obtenus varient suivant les préparations. des images de microscopie électronique L'examen fait apparaître des états d'association différents. La figure 23 (a) montre un état assez fréquemment observé dans lequel les groupes de 9 hexons sont empilés les uns sur les autres. L'analyse par gel de polyacrylamide-SDS de ces préparations révèle la présence d'hexon, de protéine IX, et aussi de protéine VI. Everitt et al. (1973) trouvent qu'en présence de 150 mM NaCl la protéine VI est détachée du groupe de 9. Nous avons donc réalisé une nouvelle purification en ajoutant 150 mM de NaCl dans les gradients. Les groupes de 9 ainsi obtenus ne contiennent plus que de l'hexon et de la protéine IX.


# Figure 23

Microscopie électronique des préparations de groupes de 9 hexons (coloration négative à l'acetate d'uranyl 1%).

- (a) Empilements de groupes de 9 (x 108000)
- (b) Juxtapositions de groupes de 9 (x 300000) et groupes de 9 isolés.

Après dialyse en présence de 100 mM phosphate de Na pH 6,2, on ne retrouve plus d'empilements en microscopie électronique. Les groupes de 9, lorsqu'ils sont réassociés, apparaissent juxtaposés en particulier par paire ou par 5 (figure 23b) ainsi que l'avaient décrit Pereira et Wrighley (1974; voir généralités, figure 5).

Suivant la méthode de purification nous obtenons donc deux réassociation: empilements (1)types de et (2). Le tableau 17 donne la série juxtapositions de maxima observés aux moyens angles (distance film-échantillon de 10 cm) correspondant à chaque type d'association. Le diagramme de diffusion des empilements (1) présente trois maxima (102,Å) qui n'apparaissent 37.5 pas 56.9. dans l'autre préparation, ni dans le calcul de Debye correspondant à la diffusion théorique de 9 points disposés comme les hexons dans les groupes de 9. Ces maxima peuvent être interprétés comme les trois premiers ordres de diffraction correspondant une distance de 113 Å entre les plans de groupes de 9 dans à l'empilement, soit approximativement la hauteur de l'hexon position du 1e pic est imprécise car très proche du (la faisceau direct; le calcul de la distance entre les plans est effectué à partir des valeurs des deux autres ordres de diffraction). Le diagramme de diffraction optique du cliché de microscopie électronique des empilements présente aussi trois maxima (105,7, 51,6 et 33,6). Ces valeurs diffèrent des valeurs déterminées par rayons légèrement Χ. En coloration négative les échantillons subissent souvent des contractions et les mesures sont alors sous-estimées.

La seconde préparation (2) présente un diagramme de diffusion semblable au diagramme de diffusion théorique de points situés à 96,5 Å de distance sur une maille hexagonale infinie (tableau 17b).

Les diagrammes de diffusion des groupes de 9 hexons, bien qu'assez complexes (sans doute à cause de leurs états d'aggrégation différents) peuvent néanmoins s'expliquer comme la diffusion d'unités protéiques situées à 100 Å: ce qui est compatible avec les résultats trouvés, pour les capsides matures et quasi-vides, par diffusion de neutrons et de rayons X.

Théorie	Groupes de	e 9 hexons	Maille he	xagonale
(a)	1	2	(b)	(h,k)
	~ 102			
81.2	80.0	83+6	83*6	(1.0)
		71.6		·
	56•9			
49-1		47•9	48.2	(1.1)
	44.3			
42.8		42.3	41.8	(2.0)
	37+5			
32*0	32.6	31+1	31+5	(2.1)
28.6	28.6		27•9	(3+0)
23•9	24.9	24.7	24.1	(2.2)
21.5	21.7			

# TABLEAU 17

Comparaison de la valeur des maxima observés par diffusion de rayons X pour deux préparations de groupes de 9 hexons (1 et 2) avec:

- a. les maxima calculés pour la diffusion de 9 points situés
   à 100 Å de distance les uns des autres et arrangés
- BUS
- de la même manière que les hexons dans les groupes de 9.
- b. les maxima calculés si les hexons sont disposés sur une maille hexagonale infinie à une distance inter hexons de 96,5 Å.

# V. CONCLUSION

La diffusion de neutrons et de rayons X par le virus et ses constituants nous a apporté deux résultats majeurs : l'un concernant la capside et l'autre le nucléoïde.

Le virus mature, le mutant d'assemblage et les groupes de 9 hexons présentent aux moyens angles  $(6x10^{-2} \le q \le 2^{n-1})$ , une série de maxima que nous avons interprétée comme venant de l'arrangement des hexons dans la capside. Cette série est absente dans le diagramme du nucléoïde. Notre interprétation implique une distance de 100 Å entre les hexons de la capside virale, donc une distance de 500 Å entre deux pentons c'est à dire entre deux sommets d'ordre 5 de l'icosaèdre. Ces mesures concordent avec celles du modèle icosaèdrique construit à partir des données de la diffusion de neutrons (mesure de l'arête de l'icosaèdre: 520 Å), et avec les mesures Brown et al. (1975) par effectuées par microscopie électronique (distance hexon-hexon de 107 Å). A partir de cette dimension de l'arête (E = 520 Å), le volume de l'icosaèdre viral est:

> $V = 2,1817 \times E^{3}$ soit  $V = 3.10 \times 10^{8} \text{\AA}^{3}$

Le poids moléculaire de l'adénovirus de type 2 mesuré par diffusion de neutrons est de  $185 \times 10^6$  (soit  $160 \times 10^6$  pour les protéines et  $25 \times 10^6$  pour le DNA). Nous pouvons donc, en utilisant les volumes spécifiques des protéines (0,73cm<sup>3</sup>/g) et du DNA (0,53cm<sup>3</sup>/g), calculer les volumes occupés par ces deux composants:

 $V_{\text{protéines}} = 160 \times 10^{6} \times 1,66 \times 10^{-24} \times 0,73$  $V_{\text{DNA}} = 25 \times 10^{6} \times 1,66 \times 10^{-24} \times 0,53$ 

soit au total:  $V_{\text{protéine}} + V_{\text{DNA}} = 2,16 \times 10^{8} \text{Å}^{3}$ . Par rapport au volume global de l'icosaèdre calculé à partir de notre modèle, on trouve donc une différence de 30%: ce volume résiduel est vraisemblablement occupé par le solvant.



а

BÜS



# Figure 24

Comparaison du modèle d'assemblage des hexons dans la capside, déduit des données de la diffusion de rayons X et de neutrons (b et c), avec le modèle (a) proposé par Nermut (1980), d'après la microscopie électronique (discussion dans la conclusion, paragraphe V). En microscopie électronique (Nermut et Perkins, 1979) et par cristallographie (Burnett et al., 1981) l'hexon apparaît comme ayant une base pseudo- hexagonale de 96x85 Å (voir figure 4). La distance entre les pentons, mesurée par Nermut (1975, 1980) en microscopie électronique, est de 430 Å. Ce dernier propose un modèle viral dans lequel les hexons sont assemblés dans la capside en un empilement compact, c'est à dire que leurs bases hexagonales s'emboîtent parfaitement (figure 24a).Dans ce modèle, les interactions entre les hexons sont alors différentes suivant qu'il s'agit des hexons du même groupe de 9, des hexons de groupes de 9 différents ou des hexons péripentonaux. La distance entre les hexons est de 85 Å et le volume est de:

 $V = 2,1817 \times 430^3 = 1,72 \times 10^8 \text{\AA}^3$ 

Le volume des constituants viraux calculé à partir de la composition chimique connue du virus (voir tableau 14) est:

 $V_{\text{protéines}} = 136 \times 10^{6} \times 1,66 \times 10^{-24} \times 0,73$  $V_{\text{DNA}} = 24 \times 10^{6} \times 1,66 \times 10^{-24} \times 0,53$ 

soit un volume total de 1,86x10<sup>8</sup> Å<sup>3</sup>. Il s'agit d'un volume minimum puisqu'il ne tient pas compte du contenu en eau du virus. Or ce volume est plus grand que celui du modèle de Nermut (1980) représentant l'assemblage compact des hexons dans la capside. Il semble donc que cet assemblage ne soit pas compatible avec les données biochimiques.

Nous proposons un modèle d'assemblage des hexons dans la capside à la figure 24b. Ils sont distants de 100 Å et des espaces vides existent entre eux. Ces espaces peuvent être remplis par des protéines de stabilisation: protéine IX entre les hexons des groupes de 9, protéine IIIa entre les pentons et les hexons péripentonaux, éventuellement protéines VI et VIII.

Le virus mature présente, en outre, un maximum de 29 Å dans son diagramme de diffusion de rayons X. Ce maximum est présent dans le diagramme du nucléoïde et absent dans les diagrammes du groupe de 9 hexons et du mutant d'assemblage. De plus, l'intensité de ce maximum est renforcée par fixation d'ions mercuriques Hg<sup>++</sup> sur le DNA.

De nombreuses expériences ont déjà été réalisées pour établir la structure interne du virus (voir généralités), mais aucun modèle n'a pu être proposé avec certitude. Le principal problème concerne l'existence hypothétique d'une structure de "type nucléosome", suggérée par Corden et al.en 1975.Or,l'action de la nucléase micrococcale sur le nucléoïde n'a pas conduit au diagramme de digestion caractéristique de la chromatine des eucaryotes et les produits de digestion du nucléoïde sont hétérogènes. Néanmoins, Mirza et Weber (1982) isolent des fragments de DNA de 150 paires de bases, associés à de la protéine VII.

Le rôle exact de la protéine V, également retrouvée dans le nucléoïde, n'est pas connu, mais cette protéine semble indispensable au maintien de l'intégrité du nucléoïde (Boulanger et Loucheux-Lefebvre, 1982). Deux localisations ont été proposées pour cette protéine: soit elle serait fixée au DNA entre les unités répétitives de 150 paires de bases (Mirza et Weber, 1982), soit elle constituerait une coque protéique protégeant le complexe DNA-protéine VII (Nermut, 1980).

Quelle que soit la structure exacte du nucléoïde, nous avons mis en évidence,grâce à la diffusion de rayons X, l'existence d'une structure régulière condensée à l'intérieur du virus. ARTICLE 4

J. Mol. Biol. (1983) 167, 119-132

# Structural Studies of Adenovirus Type 2 by Neutron and X-ray Scattering

CHRISTIANE DEVAUX<sup>†</sup>

Laboratoire de Virologie Moleculaire (INSERM U233) Place de Verdun, 59045 Lille, France

PETER A. TIMMINS

Institut Laue-Langerin 156X, 38042 Grenoble-cedex. France

AND CARMEN BERTHET-COLOMINAS

European Molecular Biology Laboratory Grenoble Outstation, c/o Institut Laue-Langevin, Grenoble, France

(Received 15 October 1982. and in revised form 27 January 1983)

Small-angle neutron and X-ray scattering have been used to investigate various aspects of the structural organization of adenovirus type 2. Neutron scattering allows the determination of the radial distribution of DNA and protein, which because of the highly icosahedral form of the virus allows it to be described in terms of three icosahedral shells. X-ray scattering shows that the distance between the major coat proteins (hexons) in the capsid is  $100\pm1$  Å. Evidence was also observed for an organization in the nucleoprotein core that gives rise to a maximum in the X-ray scattering at 1/29 Å<sup>-1</sup>.

#### 1. Introduction

Adenovirus consists of a double-stranded DNA genome folded inside an icosahedral shell (T = 25), the capsid, built from 240 capsomers on the faces and edges (the hexons) and 12 capsomers at the vertices (the pentons) (for reviews, see Philipson & Pettersson, 1973: Ginsberg, 1979). In addition at least four other proteins participate in the architecture of the capsid, IIIa<sup>+</sup> at the apices and VI, VIII and IX associated with the hexons (Everitt *et al.*, 1975). Mild disruption of the virion releases two substructures: groups of nine hexons from the faces and a nucleoprotein core (Smith *et al.*, 1965: Russell *et al.*, 1971) in which the DNA is associated with proteins V and VII (Laver *et al.*, 1968: Prage *et al.*, 1970). The

† Present address: European Molecular Biology Laboratory, Institut Laue-Langevin, 156X, 38042 Grenoble-erdex, France,

<sup>‡</sup> The proteins are named from the position of their polypeptide on sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis.

0022-2836/83/170119-14 \$03.00/0

C 1983 Academic Press Inc. (London) Ltd.

# C. DEVAUX ET AL.

structure of the major capsid protein, the hexon. is under investigation by X-ray crystallography (Burnett *et al.*, 1981), but for the virus structure models are essentially based on a combination of biochemical evidence and electron microscopy (Everitt *et al.*, 1975: Brown *et al.*, 1975: Nermut, 1980).

Capsid proteins of isometric viruses are known to be packed in a regular shell (Caspar & Klug, 1962) but very little is known about the organization of the nucleic acid-containing core. In the small plant viruses no ordered structure has so far been detected in the single-stranded RNA (reviewed by Jacrot, 1981). In isometric phage heads ( $\lambda$  and P22) most of the double-stranded DNA is thought to be coiled into cylindrically concentric shells (Earnshaw & Harrison, 1977). In polyoma and simian virus 40 viruses, where the DNA is associated with cellular histones, a structure similar to eukaryotic chromatin is present with about 20 nucleosomes closely packed within the capsid (Germond et al., 1975: Fey & Hirt, 1974). The possible presence of such a structure in adenovirus has also been investigated by micrococcal nuclease treatment. Although (orden et al. (1976) have suggested a nucleosome-like structure. Tate & Philipson (1979) failed to find the typical 200 base-pair repeating pattern of eukaryotic chromatin. Recently Mirza & Weber (1982) proposed a model where adenovirus chromatin is made of nucleosome cores with 150 base-pairs of DNA associated with six molecules of protein VII, the linker DNA being of irregular length.

To obtain further information, both on the packing of the proteins in the capsid and the proteins and DNA in the core, we have performed X-ray and neutron scattering experiments on the virus and its components. Neutron small-angle scattering was used in the angular range  $3 \times 10^{-3} \le q \le 5 \times 10^{-2} \text{ Å}^{-1}$  $(q = (4\pi \sin \theta)/\lambda: 2\theta = \text{scattering angle})$ . Variation of the contrast using buffers of different  $\text{H}_2\text{O}/^2\text{H}_2\text{O}$  mole ratios allows the data to be interpreted in terms of a radial distribution of protein and DNA. A model consisting of three icosahedral shells will be proposed. Preliminary neutron scattering studies on adenovirus type 5 have been reported by Randall *et al.* (1979).

To investigate the organization of the different components within the virus, X-ray scattering was used in the angular range  $6 \times 10^{-2} \le q \le 2 \text{ Å}^{-1}$ . X-ray data were measured from solutions of both virus and subviral components. groups of nine hexons and cores.

# 2. Materials and Methods

#### (a) Sample preparation

#### (i) Production and purification of virus and subviral components

Human adenovirus type 2, originally supplied by J. F. Williams (Carnegie Mellon Institute, Pittsburg, Pa.) was grown in KB cells maintained in suspension at  $37^{\circ}$ C for 40 h. Virus was extracted from infected cells as previously described by Boulanger & Puvion (1973), the last step of purification being a self-generating gradient of caesium chloride (Dhalluin *et al.*, 1978).

Subviral components were prepared by dialysing Ad2<sup>+</sup> particles overnight against 0.005 m-Tris HCl (pH 8.1) and treating with  $0.5^{\circ}{}_{0}^{\circ}$  sodium deoxycholate (DOC) at  $56^{\circ}C$  for

† Abbreviations used: Ad2. adenovirus serotype 2: D. deuterium.

#### STRUCTURAL STUDIES ON Ad2

90 s. The different components were separated on a  $10^{\circ}_{o}$  'to  $40^{\circ}_{o}$  glycerol gradient (Boulanger *et al.*, 1978). ('ores sediment at 180 to 200 S and groups of 9 hexons at 50 to 60 S. ('ores were immediately fixed with  $1^{\circ}_{o}$  glutaraldehyde.

### (ii) Samples for neutron scattering

Ad2 particles from the Cs(1 gradient were dialysed against a buffer containing 0.005 M-Tris H(1, 0.200 M-Na(1 (pH 8·1), to eliminate Cs(1 and then dialysed against a similar buffer made up in the appropriate  $H_2O/D_2O$  mixture and having pD 8·1. (pD = pH<sub>measured</sub> + 0.3314 X + 0.076 X<sup>2</sup>, where X is the mol ratio  $D_2O/H_2O$ ). Neutron measurements were carried out in standard quartz cells (Hellma, France) of 1 or 2 mm pathlength, on samples containing 0, 25, 40, 55, 65 and 100%  $D_2O$ . The  $D_2O$  content of each sample was checked by neutron transmission (Jacrot, 1976).

Virus concentrations were determined by absorbance at 258 nm after correction for lightscattering (Cuillel et al., 1979), using a Beckmann Acta VI spectrophotometer. The extinction coefficient  $\epsilon_{25^{\circ}}^{0.1^{\circ}}$  was determined by quantitative amino acid analysis (Rank Hilger analyser) of the viral protein using norleucine as an internal standard as described elsewhere (Devaux et al., 1982). A DNA content of  $13:3^{\circ}_{O}$  was assumed (Piña & Green, 1965). The extinction coefficient thus determined was  $\epsilon_{25^{\circ}}^{0.1^{\circ}} = 50 \text{ cm}^2/\text{mg}$ , giving a concentration considerably lower than that found by the Lowry assay (Lowry et al., 1951).

Sample concentrations were usually in the range 0.5 to 0.8 mg/ml. although one measurement was performed in H<sub>2</sub>O without removing the Cs(1 where the concentration was 5.9 mg/ml. Relatively low concentrations were necessary to avoid aggregation, which occurred especially during dialysis against  $D_2O$  containing solutions.

#### (iii) Samples for X-ray scattering

Virus from the CsCl gradient and glutaraldehyde-fixed cores from the sucrose gradient were dialysed overnight against 0.005 M-Tris HCl (pH 8.1) buffer to eliminate salt or glycerol. Groups of 9 hexons from the glycerol gradient were dialysed against the same buffer or against 0.100 M-phosphate (pH 5.0) (Pereira & Wrigley, 1974).

Dialysed virus and subviral components were pelleted into X-ray glass capillaries (Lindemann, 0.5 mm). Final pellet volumes of 0.5 to  $1.0 \,\mu$ l were used. The concentrations were approximately 200 to 300 mg/ml for virus and groups of 9 hexons and 100 to 150 mg/ml for cores.

In another set of experiments virus and subviral components were stained by addition of 0.1% mercuric chloride solution (Hg( $1_2$ ) dissolved in  $0.005 \text{ m-Tris} \cdot \text{H}(1 \text{ (pH 8-1)})$  buffer. Unbound Hg<sup>2+</sup> was removed by 2 h dialysis against Tris  $\cdot \text{H}(1 \text{ buffer})$ . All manipulations were carried out at 4%

Before exposure to X-rays all samples were examined by sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis to verify the protein composition and by electron microscopy to verify the overall structural integrity. For electron microscopy, negative staining was carried out with  $1_{0}^{\circ}$  uranyl acetate at pH 4.4 or  $1_{0}^{\circ}$  sodium phosphotungstate (pH 7).

#### (b) Data collection

#### (i) Neutron scattering

Experiments were carried out on the small-angle scattering instrument D11 (Ibel. 1976: Timmins & May, 1981) at the Institut Laue-Langevin, Grenoble. Spectra were recorded on the 64 cm×64 cm planar multidetector, using a neutron wavelength  $(\lambda)$  of 10 Å  $(\Delta\lambda/\lambda = 8^{\circ}_{o})$ and sample detector distances of 10.66 m and 4.84 m depending on the angular range being investigated. All measurements were carried out at 5°C using an automatic computer-controlled sample changer. To obtain the scattering curve I(q) versus q at any given contrast the following measurements were performed: virus in buffer solution, buffer solution alone, direct beam occluded by cadmium (to determine the ambient background).

## C. DEVAUX ET AL.

water and empty cell to calibrate the detector response and establish an absolute scale. The transmission of each sample was measured with the attenuated direct beam.

Samples were contained in standard 1 mm or 2 mm quartz cells (Hellma, France), which were masked with cadmium such that  $10 \times 7 \text{ mm}^2$  of the sample was exposed to the neutron beam. For experiments in which several subsidiary maxima were measured a collimation distance of twice the sample detector distance was used. The raw data were reduced to a set of radially averaged curves, background subtracted and corrected for differential detector response using standard programs (Ghosh, 1982).

## (ii) X-ray scattering

Scattering patterns were recorded on film (Kodak, No-Screen) using a double focusing system consisting of a Franks mirror and a quartz crystal monochromator with a cut angle of 0° or 8°. The X-ray source was an Elliot GX13 rotating anode tube with electron beam size  $100 \,\mu\text{m} \times 1$  mm on the anode. Specimen-to-film distances were 100 mm or 1000 mm allowing observation in the range  $q = 6 \times 10^{-3}$  to 2 Å<sup>-1</sup>.

#### (e) Data analysis

## (i) Neutron scattering

The corrected scattering curves for the virus in different  $H_2O/D_2O$  contrasts were analysed in 2 ways. Those at the smallest angles were used to determine the intensity at the origin I(O) and the radius of gyration  $R_g$ . This was done in the first place by means of a Guinier plot  $(\ln I(q) \ versus q^2)$  which in the region  $qR_g \leq 1$  should be linear and whose slope gives  $R_g$  and extrapolation to q = 0 gives I(O). These plots were, however, not very satisfactory as the Guinier zone  $(qR_g \leq 1)$  was not well covered and a small amount of aggregation in the samples tended to overestimate both I(O) and  $R_g$ . These parameters were therefore also determined by fitting a low-resolution 2-shell model to the whole of the central maximum. In this wayI(O) was obtained by extrapolating the model curve to q = 0and  $R_g$  calculated from the fitted model.

Scattering curves at higher angles were analysed by a model-fitting approach using a program written by D. Schneider and M. Zulauf (Schneider *et al.*, 1978). The approach is as described by Timmins & Jacrot (1983) and consists of fitting the scattering function of a model composed of spherical shells of variable density, convoluted with the instrumental smearing parameters to the observed scattering curve. This procedure is carried out independently for the scattering curves measured at different contrasts. The major criteria for a correct model are then the quality of each fit and the consistency of the models obtained as a function of the contrast.

# (ii) X-ray scattering

Each film was scanned on an Optronix P1000 densitometer using a  $25 \ \mu m$  raster setting. These numerical data were stored in a 2-dimensional array, which could be visualized directly on a Tektronix display terminal. The data were then circularly averaged about the beam centre. The background, as measured by the scattering of a similar capillary filled with appropriate buffer, was subtracted from each sample scattering curve.

## 3. Results

#### (a) Neutron scattering

## (i) I(O) and $R_a$

Two important model-independent parameters obtained from the lowest angle data are the intensity at the origin I(O) and the radius of gyration  $R_g$ . Figure 1 shows

#### STRUCTURAL STUDIES ON Ad2



FIG. 1. Plot of  $R_g^2$  reveaus reciprocal contrast  $1/\tilde{\rho}$  (Stuhrmann plot),  $R_g$  values were determinated at a sample-detector distance of 10.66 m from a low-resolution 2-shell model (see data analysis). At infinite contrast, the  $R_g$  of the particle is 339 Å.

the plot of  $R_g^2$  versus reciprocal contrast  $1/\bar{\rho}$  (Stuhrmann plot). This is a straight line of positive slope indicating a particle with higher scattering density near the centre of mass as would be expected. The radius of gyration at infinite contrast is 339 Å. It is important to note that this does not correspond to the radius of gyration of the particle envelope with homogeneous density but to that of a larger particle. This is due to the inhomogeneity of exchange of labile hydrogens in different regions of the particle (Jacrot, 1976: Cusack, 1983).

The plot of  $\sqrt{I(0)/c}$  versus contrast (Fig. 2) indicates an overall match point for the virus of 45.6% D<sub>2</sub>O.

#### (ii) Molecular weight

The intensity at the origin (I(O)), as defined above) can be used to calculate the molecular weight of a particle in solution using the following expression (Jacrot & Zaccai, 1981):

$$\frac{I(0)}{I_{\rm H,0} \cdot c} = 4\pi \frac{T_{\rm S}}{1 - T_{\rm H,0}} \cdot M \cdot N_{\rm A} \cdot 10^{-3} t \left(\frac{\Sigma b - \rho_{\rm S} V}{M}\right)^2,\tag{1}$$

where:  $I_{\rm H_2O}$  is the neutron intensity scattered by a sample of  $\rm H_2O$  under identical experimental conditions as the particle under investigation:  $T_{\rm S}$  is the neutron transmission of the sample:  $T_{\rm H_2O}$  is the neutron transmission of  $\rm H_2O$ : M is the molecular weight of the sample: t is the thickness of sample in cm:  $N_{\rm A}$  is the Avogadro number: c is the concentration of sample in mg/ml:  $(\Sigma b - \rho_{\rm S} V)/M$  is the excess scattering length per dalton of sample:  $\rho_{\rm S}$  is the scattering length density of the solvent: and V is the particle volume.

The term  $(\Sigma b - \rho_S V)/M$  can be calculated if the chemical composition of the virus is known as well as the exchange of its labile hydrogens. Molecular weight measurements are usually carried out in H<sub>2</sub>O solvent where the exchange



FIG. 2. Variation of the square root of I(O)/c (in arbitrary units) with the percentage of D<sub>2</sub>O in the buffer. I(O) is the intensity at the origin obtained by extrapolating the 2-shell model curve to q = 0. c is the concentration of the virus. This plot indicates a match point for the virus of 456°<sub>0</sub> D<sub>2</sub>O.

parameter does not exist and thus  $\Sigma b/M$  can be easily calculated. In addition any error in  $\rho_{\rm S} V$  is minimized because  $\rho_{\rm S}$  for H<sub>2</sub>O is small.

In this case an average value of  $\Sigma b/M$  taken from a wide range of proteins was used (Jacrot & Zaccai, 1981). Similarly a  $\Sigma b/M$  corresponding to an equimolar base composition was used for the DNA. Thus for adenovirus dissolved in H<sub>2</sub>O, assuming a DNA content of 13.3%, the expression (1) can be reduced to:

$$\frac{I(O)}{I_{\rm H,O} \cdot c} = 61 \times 10^{-8} M.$$

The concentration as measured from the Lowry method was unreliable and final concentrations were determined by u.v. absorbance using an extinction coefficient determined from quantitative amino acid analysis (see Materials and Methods).

The molecular weight thus obtained was  $185(\pm 20) \times 10^6$ .

# (iii) Model fitting

Models consisting of three spherical shells of variable scattering length density were fitted to the data at each contrast. The effect due to the fibres attached to the pentons was ignored as these represent only 1% of the viral mass.

For this fitting the same shell radii and instrumental smearing parameters were used for each contrast whilst the shell densities were allowed to vary independently for each contrast. The data at high contrast (particularly 0% and 100% D<sub>2</sub>O) were of significantly higher quality showing four subsidiary maxima whereas the lower contrasts showed only the first two maxima. The fit of the model to the 100% D<sub>2</sub>O data is shown in Figure 3.

The final model obtained consists of three shells of radii 303, 348 and 420 Å. The scattering length densities of each shell for each contrast are shown in Table 1. Figure 4 is a plot of the scattering length density of each shell as a function of



FIG. 3. Fit of the spherical model to the intensity (I(q)) scattered by the virus in  $100^{\circ}$ ,  $D_2O$ . (+++) Experimental values: (-----) the intensity calculated with instrumental smearing, from the 3-shell model. Dimensions and absolute densities are given in Table 1 and are shown in the inset.

contrast, the linearity of each shell density with contrast being an indication of the internal consistency of the model. This Figure also shows that the excess scattering length density in the outer two shells falls to zero at solvent scattering length densities corresponding to  $D_2O$  mole fractions of 0.42 and 0.43, showing them to be composed entirely of protein. The core, on the other hand, has a match point of 0.55 mole fraction  $D_2O$  consistent with a protein–DNA complex. Moreover, the scattering length densities being on an absolute scale and knowing the average scattering length density of DNA and of the protein we may calculate the amount of each moiety in each shell, the residual volume being water. The excess scattering length densities used were as follows (Timmins & Jacrot, 1983):

DNA 
$$\rho - \rho_{\rm S} = (4.04 - 6.22X) \times 10^{-14} \text{ cm Å}^{-3}$$
  
Protein  $\rho - \rho_{\rm S} = (2.43 - 5.84X) \times 10^{-14} \text{ cm Å}^{-3}$ ,

where X is the mole fraction of  $D_2O$  in the solvent.

The percentages and molecular weight of protein, DNA and water in each shell are given in Table 2. The total amount of water corresponds to 30% of the virus volume.

The model described above is a spherical approximation to the virus but electron microscopy shows adenovirus to be a near perfect T = 25 icosahedron.

Absolute scattering length densities as a function of contrast (  $\times 10^{-14}$  cm  $A^{-3}$ )  $\circ_{0} D_{2}O$ 

TABLE 1

Shell	$\mathbf{O}_{\mathbf{O}} \cdot \mathbf{D}_{2} \mathbf{O}$					
	0	25	-40	55	65	100
L , 0-303 Å	1.48	0.80	0.44	0	-0-29	-1.38
11 303-348 Å	1.76	0.86	0.32	-0.53	-1.10	-2.33
III 348–420 Å	2.19	0.80	0.80	-0.68	-1.18	-3.07



FIG. 4. Variation of the absolute scattering length densities with the percentage of  $D_2O$  in buffer for each shell of the model. (-+--+-) 0 to 303 Å:  $(-\bigcirc -\bigcirc \bigcirc -) 303$  to 348 Å: (-+--+-) 348 to 420 Å.

We may therefore construct from our spherical shell model of radius 420 Å a more realistic icosahedral model which for the same scattering properties must have the same volume as the sphere. We are therefore led to propose an icosahedral model where the radius at the 5-fold symmetry position is 496 Å and the length of the icosahedral edge (penton-penton distance) is 520 Å. The volume of this model like that of the spherical model is  $3\cdot10 \times 10^8$  Å<sup>3</sup>. If we put into this model, shells of the same thickness as found for the spherical model then the shell volumes for the two models are identical to within  $1^{\circ}_{0}$  and thus the contents of each shell may be interpreted in the same manner. Although the differences in scattering for the two models at higher angles are not simply calculated. Bogarintsova *et al.* (1975) have shown that at least for an homogeneous solid sphere and icosahedron the differences are minor up to the fifth subsidiary maximum, corresponding to the limit of our experimental data. The spherical and icosahedral shell models are compared in Figure 5.

 TABLE 2

 Protein, DNA and water content of each shell

Shell	Fraction			Molecular weight		
	Protein	DNA	Water	Protein	DXA	
1 0-303 Å	0.28	0.20	0.52	$29 \times 10^{6}$	$25 \times 10^{6}$	
11 - 303348 Å	0.66	0.04	0.30	$32 \times 10^{6}$	$3 \times 10^{6}$	
HI 348~420 Å	0.90	0	0.10	$94 \times 10^{6}$	0	

The errors in the fractions are about 0.05, thus the DNA content in shell II is probably not significant.





FIG. 5. Schematic representations of (a) the spherical model of radius 420 Å fitted to the neutron scattering data and (b) the T = 25 icosahedral model more representative of the adenovirus form. The 2 models have identical volumes  $(3.10 \times 10^8 \text{ Å}^3)$  and radial distributions of protein and DNA.

The radius of the icosahedral model at the 5-fold position is 496 Å and the distance between 2 adjacent 5-fold positions (penton-penton) is 520 Å.

## (b) X-ray scattering

# (i) Natire samples

X-ray scattering patterns from solutions of native virus at low angles  $(6 \times 10^{-3} \le q \le 6 \times 10^{-2})$  Å<sup>-1</sup> show the series of maxima and minima characteristic of a quasi-spherical particle as seen also by neutron scattering. At higher angles  $(6 \times 10^{-2} \le q \le 2$ Å<sup>-1</sup>) another series of maxima is observed which in this case must be due to internal structural features of the virus (Fig. 6(b)). The scattering pattern of a series of points placed 100 Å apart on a T = 25 lattice was calculated by means of a Debye (1915) calculation, shown in Figure 6(a), and explains very well the dominant features of the scattering pattern. We therefore conclude that the distance between hexons in the native virus is  $100 \pm 1$ Å. ('onsequently the distance between adjacent 5-fold positions (pentons) is about 500 Å in good agreement with the 520 Å derived for the icosahedral model from neutron scattering.

To further investigate the scattering pattern of the virus we also measured the scattering pattern from viral cores and groups of nine hexons obtained by deoxycholate treatment.

Isolated cores showed (Fig. 6(c)) a single broad maximum at a spacing of 29 Å, which can in fact also be seen in the native virus pattern as a diffuse peak underlying the more detailed pattern from the capsid structure.

Preparations of groups of nine hexons showed a series of maxima in the range from 1/85 Å<sup>-1</sup> to 1/12 Å<sup>-1</sup> rather similar to those found for the virus. The number and exact positions of these peaks were, however, dependent on the precise conditions of preparation, in particular their state of aggregation. A more detailed report of these observations will be published at a later date.

#### (ii) Stained samples

The X-ray patterns obtained from samples of virus stained with mercuric chloride and native samples are compared in Figure 7(a). The only significant difference between the two is the very strong enhancement of a ring at  $1/29 \text{ Å}^{-1}$ 



C. DEVAUX ET AL.

FIG. 6. Comparison between (a) the curve showing the scattering of a series of points 100 Å apart on a T = 25 lattice obtained by the Debye calculation and the curves from X-ray scattering of (b) the native virus and (c) cores.

(b) and (c) are the scans of the X-ray films where the background has been subtracted.

ARTICLE 4



FIG. 7. X-ray scattering patterns from (a) virus and (b) viral cores. The left-hand Figures are from native particles and the right-hand ones are from stained particles.

.

# C. DEVAUX ET AL.

in the stained sample. A similar result was obtained by staining solutions of cores (Fig. 7(b)). The 1/29 Å<sup>-1</sup> ring is enhanced and a faint maximum appears at 1/45 Å<sup>-1</sup>. Such an enhancement is not observed in stained groups of nine.

To check the localization of the stain in the various components their u.v. spectra were recorded as a function of  $Hg^{2+}$  concentration. Both dilute solutions of viral cores and virus showed a shift in the absorption maximum from 258 to 272 nm (not shown) as expected when  $Hg^{2+}$  ions form complexes with nucleic acids (Thomas, 1954: Yamane & Davidson, 1961). The spectrum of groups of nine was unchanged showing the normal 278 nm maximum in both native and stained states. This in itself, however, does not exclude the possibility of  $Hg^{2+}$  binding to protein. The fact that the X-ray patterns from groups of nine hexons are also unchanged after staining strongly implies that little specific binding takes place and that the effects observed in the whole virus are chiefly due to binding to the DNA.

# 4. Discussion

Most structural studies on adenovirus have up till now been carried out using electron microscopy and biochemical techniques. An important exception is the high resolution crystallographic study of the hexon (Burnett et al., 1981). The results we present here complement previous studies and have the advantage that they are obtained from molecules maintained in the native state in solution. A number of important results emerge. The molecular weight found for the virus from neutron scattering  $(185(\pm 20) \times 10^6)$  is in agreement with that determined by Green et al. (1967) from electron microscopic measurement of DNA length (DNA  $24.4 \times 10^6$ : virus  $183.5 \times 10^6$ ) and from the sedimentation coefficient of DNA (DNA  $23 \times 10^6$ : virus  $172.9 \times 10^6$ ) both assuming a DNA content of 13.3% in the virus (Piña & Green, 1965). This molecular weight determination allows us at the same time to place the scattering length densities in the neutron model on an absolute scale (Table 1) and to determine the mass of proteins and DNA in each shell of the model (Table 2). We see from this model that the outer two shells are composed entirely of protein but the outer part is rather denser than the inner part. The total thickness of protein (117 Å) corresponds very closely to the height of the hexon as determined from X-ray crystallography and electron microscopy (Berger et al., 1978: Nermut, 1975).

The medium-angle X-ray pattern from the virus shows a series of maxima and minima. Most of them are explained by the scattering of the capsid proteins, the hexons. The main result obtained is the determination of a hexon-hexon distance of 100 Å, which implies a penton-penton distance of about 500 Å. This penton-penton distance can also be deduced from the neutron model. The highly icosahedral shape of adenovirus is well known from electron microscopy observation (Horne *et al.*, 1959): it is thus possible to extend the interpretation in terms of a spherical model to one of an icosahedral model. The edge of the icosahedron thus obtained is 520 Å, a value that confirms the X-ray results. X-ray and neutron measurements of the hexon-hexon distance (100 Å) and penton-penton distance (500 to 520 Å) are in good agreement with the values of 107 Å

#### STRUCTURAL STUDIES ON Ad2

and 535 Å, respectively determined by Brown *et al.* (1975) but are considerably greater than those of 85 Å and 430 Å determined by Nermut (1975). This puts powerful constraints on the ways in which hexons can aggregate in the capsid. In addition, any future model for the positions of the other capsid proteins that are associated with the hexon (Everitt *et al.*, 1975) must be consistent with the radial densities found for the neutron scattering model.

The comparison between the X-ray scattering patterns of native virus, cores and groups of nine hexons permits the observation of a maximum in the pattern from virus and cores at a spacing of  $1/29 \text{ Å}^{-1}$ , which we interpret as being due to the packing of the DNA in the core. It has been confirmed that this maximum is effectively due to the DNA by its enhancement on staining with Hg(1<sub>2</sub>. Although staining also of the proteins cannot be rigorously excluded, the fact that scattering patterns of groups of nine hexons are unchanged with staining implies that binding of mercury at least to the capsid is rather low.

There have up till now been contradictory reports as to whether the adenovirus nucleoprotein core contains a nucleosome-like structure similar to that of eukaryotic chromatin (Corden *et al.*, 1976: Tate & Philipson, 1979). It seems nevertheless that there exists a unit repeat of about 150 base-pairs of DNA associated with basic protein VII (Mirza & Weber, 1982: Sato & Hosokawa, 1981). Although recently it has been demonstrated that the other core protein (V) is essential for the integrity of the core structure (Boulanger & Loucheux-Lefebvre, 1982), it is not clear whether it is associated with linker DNA (Mirza & Weber, 1982) or a component of a core shell (Nermut, 1980). Our results would indicate that although we do not observe the characteristic X-ray scattering of eukaryotic chromatin we present for the first time evidence for the possible existence of a regular condensed structure. Further studies are necessary to investigate whether this structure is merely a side-by-side aggregation of nucleoprotein filaments at 29 Å distance or a more complex nucleosome-like structure.

The authors are grateful to P. A. Boulanger and B. Jacrot for constant encouragement and helpful discussions and S. Cusack for the Debye calculation illustrated in Figure 6(a). We thank also C. Cousin and D. Petite for production of virus stock and cells and E. Truche for the amino acid analysis.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche médicale (U233), the Centre National de la Recherche Scientifique (ERA225), the Université du Droit et de la Santé (UERIII), the Ministrie de l'Industrie et de la Recherche, contract 80-7-0290.

#### REFERENCES

Berger, J., Burnett, R. M., Franklin, R. M. & Grütter, M. (1978). Biochim. Biophys. Acta, 535, 233-240.

Bogarintsova, A. K., Dembo, A. T., Rolbin, In. A. & Feigin, L. A. (1975). Soviet Crystallographica, 20, 149-152.

Boulanger, P. & Loucheux-Lefebvre, M. H. (1982). Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 470-480.

Boulanger, P. & Puvion, F. (1973). Eur. J. Biochem. 39, 37-42.

Boulanger, P., Devaux, C. & Loucheux-Lefebvre, M. H. (1978). FEBS Letters, 85, 52-56.

Brown, D. T., Wesphal, M., Burlingham, B. T., Winterhoff, U. & Doerfler, W. (1975), J. Virol. 16, 366-387.

#### C. DEVAUX ET AL.

Burnett, R. M., Grütter, M. G. & White, J. L. (1981). In Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules (Balaban, M., ed.), pp. 865–868. Alpha Press, Jerusalem.

Caspar, D. L. D. & Klug, A. (1962). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1-24.

Corden, J., Engelking, H. M. & Pearson, G. D. (1976). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A, 73, 401–404.

Cuillel, M., Tripier, F., Braunwald, J. & Jacrot, B. (1979). Virology, 99, 277-285.

Cusack, S. (1983). In Brookhaven Symposium on Neutron Scattering in Biology (Schoenborn, C., ed.), Plenum Press, New York, in the press.

Debye, P. (1915). Ann. Phys. (Leipzig), 46, 2927-2929.

Devaux, C., Zulauf, M., Boulanger, P. & Jacrot, B. (1982). J. Mol. Biol. 156, 927-939.

Dhalluin, J. C., Martin, G. R., Torpier, G. & Boulanger, P. (1978), J. Virol. 26, 357-363.

Earnshaw, W. C. & Harrison, S. C. (1977). Nature (London), 268, 598-602.

Everitt, E., Lutter, L. & Philipson, L. (1975). Virology, 67, 197-208.

Fey, G. & Hirt, B. (1974). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 235-241.
Germond, J. E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellard, M. & Chambon, P. (1975). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 72, 1843-1847.

Ghosh, R. (1982). Institut Laue-Langevin Internal Report No. 81GH29T.

Ginsberg, H. S. (1979). In Comprehensive Virology (Fraenkel-Conrat. H. & Wagner, R. R., eds), vol. 14, pp. 409–448, Plenum Press, New York.

Green, M., Piña, M., Kimes, R., Wensink, P. C., MacHattie, L. A. & Thomas, C. A. (1967). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A, 57, 1302–1309.

Horne, R. W., Brenner, S., Waterson, A. P. & Widy, P. (1959). J. Mol. Biol. 1, 84-86.

Ibel. K. (1976). J. Appl. Crystallogr. 9, 630-643.

Jaerot, B. (1976). Rep. Prog. Phys. 39, 911-953.

Jacrot, B. (1981). In Comprehensire Virology (Fraenkel-Conrat. H. & Wagner, R. R., eds), vol. 17, pp. 129–181. Plenum Press, New York.

Jacrot. B. & Zaccaï, G. (1981). Biopolymers, 20, 2413-2426.

- Laver, W. G., Pereira, H. G., Russell, W. C. & Valentine, R. C. (1968), J. Mol. Biol. 37, 379-386.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951), J. Biol. Chem. 193, 265–275.

Mirza, M. A. & Weber, J. (1982). Biochim. Biophys. Acta, 696, 76-86.

Nermut, M. V. (1975). Virology. 65, 480-495.

Nermut. M. V. (1980). Arch. Virol. 64, 175-196.

Piña, M. & Green, M. (1965). Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A. 54, 547-551.

Pereira, H. G. & Wrigley, N. G. (1974). J. Mol. Biol. 85, 617-631.

- Philipson, L. & Pettersson, U. (1973). In Progress in Experimental Tumor Virus Research (Homburger, F., ed.), vol. 18, pp. 1–55, 8, Kargel, Basel.
- Prage, L., Pettersson, U., Hoglund, S., Lonberg-Holm, K. & Philipson, L. (1970). Virology, 42, 341–368.

Randall, J. T., Gilmour, S., Mautner, V. & Torbet, J. (1979). Annual Report. Institut Laue-Langevin.

Russell, W. C., McIntosh, K. & Skehel, J. J. (1971), J. Gen. Virol. 11, 35-45.

Sato, K. & Hosokawa, K. (1981). Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 304-310.

Schneider, D., Zulauf, M., Schafer, R. & Franklin, R. M. (1978). J. Mol. Biol. 124, 97-122.

Smith, K. O., Gehle, W. D. & Tronsdale, M. D. (1965). J. Bacteriol. 90, 254-261.

Tate, V. E. & Philipson, L. (1979). Nucl. Acids Res. 6, 2769-2785.

Thomas, C. A. (1954), J. Amer. Chem. Soc. 76, 6032-6034.

Timmins, P. A. & Jacrot, B. (1983). In Neutron Scattering in Molecular Biology (Worcester, D. L., ed.). Elsevier/North Holland. Amsterdam, in the press.

Timmins, P. A. & May, R. (1981). Institut Laue-Langevin Internal Report No. 81TI538. Yamane, T. & Davidson, N. (1961). J. Amer. Chem. Soc. 83, 2599–2607.

Edited by V. Luzzati

L'utilisation de plusieurs techniques physiques (diffusion de neutrons et de rayons X, cristallographie, diffusion de lumière, centrifugation analytique), combinée à des analyses biochimiques plus classiques, nous a conduit à réviser certaines connaissances sur la structure de l'adénovirus.

Tout d'abord, le poids moléculaire de deux protéines virales, la base du penton et la fibre, a pu être précisé. La base du penton, bien qu'entourée de cinq hexons, est un trimère; et la fibre, qui lui est associée, est un dimère. Ces résultats posent donc un problème de symétrie au niveau de l'apex de la capside et nous ont amené à supposer un rôle important joué par la protéine IIIa, localisée entre les hexons et le penton.

D'autre part, un modèle structural pour l'adénovirus a été proposé d'après nos résultats de diffusion de neutrons et de rayons X.

dimensions du virus sont plus grandes que celles Les habituellement mesurées par la microscopie électronique. Ces dimensions et la distribution de densité de la matière dans notre modèle, imposent des contraintes dans l'assemblage des hexons et dans la répartition des protéines mineures de la capside (VI, VIII et IX). De plus, une structure régulière (à 1/29 Å) a été mise en évidence par diffusion de rayons X, à l'intérieur du virus. Elle correspond à l'arrangement du DNA et des protéines.

nous proposons de poursuivre ce travail Nous par une étude à haute résolution de cristaux de fibre. Elle comportera d'abord la mise au point de monocristaux, puis laétudes biochimiques à réalisation des indispensables l'interprétation des clichés de rayons X.

Nous voudrions également, toujours par l'utilisation des techniques physico-chimiques, préciser notre modèle structural du virus en entreprenant une série de recherches portant sur:

- la composition chimique du virus qu'il serait intéressant de connaître avec précision, pourcentage de DNA en particulier;
- la localisation des protéines VI, VIII et IX dans la capside;
- les interactions protéines-protéines, notamment celles de la protéine IIIa avec l'hexon et le penton;
- les interactions DNA-protéines;
- les changements de structure de la particule virale au cours de la morphogénèse, par l'étude des intermédiaires d'assemblage (poursuite des expériences avec le mutant H<sub>2</sub>ts112) et des jeunes virions (à l'aide du mutant H<sub>2</sub>ts104).

# REFERENCES

- Aleström, P., Akusjärvi, G., Perricaudet, M., Mathews, M.B., Klessig, D.F. et Pettersson, U. (1980) Cell, <u>19</u>, 671-681.
- Anderson, C.W., Baum, P.R. et Gesteland, R.F. (1973) J.Virol 12, 241-252.
- Bensadoun, A. et Weinstein, D. (1976) Anal. Biochem. <u>70</u>, 241-250.
- Berk, A.J. et Sharp, P.A (1978) Cell 14, 695-711.
- Berger, J., Burnett, R.M., Franklin, R.M. et Grütter, M. (1978) Biochem. Biophys. Acta <u>535</u>, 233-240.
- Berget, S.M., Moore, C. et Sharp, P.A. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>74</u>, 3171-3175.
- Bhatti, A.R. et Weber, J. (1979) Virology <u>96</u>, 478-487.
- Boudin, M.L. et Boulanger, P. (1981) Virology 113, 781-786.
- Boudin, M.L. et Boulanger, P. (1982) Virology 116, 589-604.
- Boudin, M.L., D'Halluin, J.C., Cousin, C. et Boulanger, P. (1980) Virology 101, 144-156.
- Boudin, M.L., Moncany, M., D'Halluin, J.C. et Boulanger, P. (1979) Virology <u>92</u>, 125-138.
- Boulanger, P., Devaux, C. et Loucheux-Lefebvre, M.H. (1978) FEBS Letters 85, 52-56.
- Boulanger, P., Lemay, P., Blair, G.E. et Russell, W.C. (1979) J. Gen. Virol. 44, 783-800.
- Boulanger, P. et Lonberg-Holm,K. (1981)" Receptors and Recognition", vol. 8. Virus receptors part 2, Animal viruses pp 21-46 (Lonberg-Holm, K. et Philipson, L. eds.) Chapman and Hall, London et NY.
- Boulanger, P. et Loucheux-Lefebvre, M.H. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>47</u>, 194-201.
- Boulanger, P. et Loucheux-Lefebvre, M.H. (1982) Biochem. Biophys. Res. Commun. <u>107</u>, 470-480.
- Boulanger, P. et Philipson, L. (1981)" Receptors and Recognition", vol. 8, Virus receptors part 2, Animal viruses pp 117-140 (Lonberg-Holm, K. et Philipson, L. eds.) Chapman et Hall, London et NY.

- Boulanger, P. et Puvion, F. (1973) Eur. J. Biochem. <u>39</u>, 37-42.
- Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72, 248-254.
- Brenner, S. et Horne, R.W. (1959) Biochem. Biophys. Acta <u>34</u>, 103.
- Brown, D.T., Westphal, M., Burlingham, B.T., Winterhoff, V. et Doerfler, W. (1975) J. Virol. <u>16</u>, 366-387.
- Burlingham, B.T., Brown, D.T. et Doerfler, W. (1974) Virology 60, 419-430.
- Burnett, R.M., Grutter, M.G. et White, J.L. (1981) Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules (Balaban, M Ed.) pp 865-868. Alpha press, Jerusalem.
- Caspar, D.L.D. et Klug, A. (1962) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1-24.
- Cepko, C.L. et Sharp, P.A. (1982) Cell 31, 407-415.
- Chauvin, C. (1978) Thèse, Université de Grenoble.
- Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R. et Roberis, R.J. (1977) Cell 12, 1-8.
- Colby, W.W. et Shenk, T. (1981) J. Virol. 39, 977-980.
- Corden, J., Engelking, H.M. et Pearson, G.D. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 401-404.
- Cornick, G., Sigler, P.B. et Ginsberg, H.S. (1971) J. Mol. Biol. 57, 397-401.
- Crick, F.H.C. et Watson, J.D. (1956) Nature (London) <u>177</u>, 473-475.
- Cuillel, M (1981) Thèse d'état, Université de Grenoble.
- Cusack, S. (1981) J. Mol. Biol. 145, 539-541.

Daniell, E. (1976) J. Virol. 19, 685-708.

- Day, L.A., Franklin, R.M., Pettersson, U. et Philipson, L. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 537-541.
- D'Halluin, J.C. (1980) Bul. de l'Institut Pasteur <u>78</u>, 347-405.
- D'Halluin, J.C., Martin, G.R., Torpier, G. et Boulanger, P. (1978b) J. Virol. 26, 357-363.
- D'Halluin, J.C., Milleville, M. et Boulanger, P. (1980) Nucl. Acid Res. 8, 1625-1641.
- D'Halluin, J.C., Milleville, M., Boulanger, P. et Martin, G.R. (1978a) J. Virol. 26, 344-356.

Durchschlad, H. et Jaenicke, R. (1982), Biochem. Biophys. Res. Commum. 108,1074-1079. Edvardsson, B., Everitt, E., Jornvall, H., Prage, L. et Philipson, L. (1976) J. Virol. 19, 533-547. Eisenberg, D. (1970) "The Enzymes", 3<sup>d</sup> ed. vol. 1 (Boyer, P.D. ed.)p1. Academic Press, NY. Enge, Meyerhoff et Schulz (1968) Naturforsch. 13, 713. J.F., Bell, J.A., Dingle, J.H., Francis, Enders. Τ., Hilleman, M.R., Huebner, R.J. et Payne, A.M.M. (1956) Science 124, 119-121. Everitt, E. et Philipson, L. (1974) Virology 62, 253-269. Everitt, E., Lutter, L. et Philipson, L. (1975) Virology 67, 197-205. Everitt, E., Sundquist, B., Pettersson, V. et Philipson, L. (1973) Virology 52, 130-147. Finch, J.T. (1972) Contemp. Phys. <u>13</u>, 1. Finch, J.T. et Holmes, K.C. (1967) dans "Methods of Virology" vol. 3 (K. Maramorosh et H. Koprowsi eds.) pp 351-474, Academic press NY. Finch, J.T. et Klug, A. (1959) Nature 183, 1709-1714. Flint, S.J. (1980) "DNA Tumor Viruses, Molecular biology of Tumor Viruses" 2nd ed. part 2 (J. Tooze ed.) pp 383-442, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. Franklin, R.M., Pettersson, V., Akervall, R., Strandberg, B. et Philipson, L. (1971) J. Mol. Biol. 57, 383-395. Freeman, A.E., Black, P.H., Van der Pool, E.A., Henry, P.H., Austin, J.B. et Huebner, R.J. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 1205-1212. Gambke, C. et Deppert, W. (1981) J. Virol. 40, 585-593. Garon, C.F., Berry, K.W. et Rose, J.A. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2391-2395. Ginsberg, H.S. (1979) "Comprehensive Virology" 13, 409-457. (Fraenkel-Conrat, H. et Wagner, R.R. eds.) New York-Londres, Plenum press. Ginsberg, H.S., Ensinger, M.J., Kauffman, R.S., Mayer, A.J. et Lundholm, U. (1974) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 419-426. Gingeras, T.R., Sciaky, D., Gelinas, R.E., Bing-Dong, J., Yen, C.E., Kelly, M.M., Bullock, P.A., Parsons, B.L.,

O'Neill, K.E. et Roberts, R.J. (1982) J. Biol. Chem. <u>257</u>, 13475-13491.

Green, M. (1970) Ann. Rev. Biochem. 39, 701-756.

Green, M, Mackey, J.K., Wold, W.S.M. et Rigden, P. (1979) Virology, 93, 481-492.

- Green, M. et Pina, M. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>51</u>, 1251-1259.
- Green, M., Pina, M., Kimes, R., Wensink, P.C., McHattie, L.A. et Thomas, C.A. (1967) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>57</u>, 1302-1309.
- Green, N.M., Wrighley, N.G., Russell, W.C., Martin, S.R. et McLachlan, A.D. (1983) Embo J. 8, 1357-1365.

Guinier, A. et Fournet, G. (1955) "Small angle scattering of X-rays". Wiley, New York, Chapman et Hall, London.

Hall, C.E. (1955) J. Biophys. Biochem. Cytol. <u>1</u>, 1-Hammarskold, M.L., Winberg, G., Norrby, E. et Wadell, G.

(1977) Virology 82, 449-461.

- Harrison, S.C. (1969) J. Mol. Biol. 42, 457-483.
- Harrison, S.C. (1980) Nature 286, 558-559.

Harrison, S.C., Olson, A.J., Schutt, C.E., Winkler, F.K. et Bricogne, G. (1978) Nature <u>276</u>, 368-373.

Harter, M.L. et Lewis, J.B. (1978) J. Virol. 26, 736-742.

Harter, M.L., Shannugan, G., Wold, W.S.M. et Grem, M. (1976) J. Virol. 19, 232-242.

- Hashimoto, S. et Green, M. (1979) Virology 94, 254-265.
- Hennache, B. et Boulanger, P. (1977) Biochem. J. <u>166</u>, 237-246.
- Hennache, B., Torpier, G. et Boulanger, P. (1979) Exp. Cell Res. 124, 139-150.
- Herissé, J. et Galibert, F. (1981) Nucl. Acid. Res. <u>9</u>, 1229-1240.
- Herissé, J., Rigolet, M., Dupont de Dinechin, S. et Galibert, F. (1981) Nucl. Acid. Res. 9, 4023-4042.

Herissé, J. (1982) Bul. Inst. Pasteur 80, 197-212.

- Horne, R.W. (1977) "Analytical and quantitative methods in microcopy", pp 29-53 (Meek, G.A. et Elder, H.Y. eds) Cambridge University Press.
- Horne, R., Brenner, S., Waterson, A.P. et Wildy, P. (1959) J. Mol. Biol. 1, 84-86.

Hosokawa, R. et Sung, M.T. (1976) J. Virol. 17, 924-934. Huebner, R.J., Casey, M.J., Chanock, R.M. et Scheel, K. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 381-388. Ishibachi, M. et Maizel, J.V. (1974a) Virology 58, 345-361. Ishibachi, M. et Maizel, J.V. (1974b) Virology <u>57</u>, 409-424. Jacrot, B. (1976) Rep. Prog. Phys. 39, 911-953. Jacrot, B. (1981) "Comprehensive Virology" 17,pp 129-181 (Fraenkel-Conrat, H. et Wagner, R.R. eds.) Plenum Press, NY. Jacrot, B. et Zaccai, G. (1981) Biopolymers 20, 2431-2426. Jones, N. et Shenk, T. (1978) Cell 13, 181-188. Jornvall, H. Akusjarvi, G., Alestrom, P., Gahr-Lindstrom, Η. Pettersson, U., Appella, E., Fowler, A.U. et Philipson, L. (1981) J. Biol. Chem. 256, 6181-6186. Jornvall, H., Ohlsson, H. et Philipson, L. (1974) Biochem. Biophys. Res. Comm. 56, 304-310. Klug, A. (1983) Nature 303, 378-379. Klug, A., Longley, W. et Leberman, R. (1966) J. Mol. Biol. 15, 315-343. Krogan, H., Schaffer, P. et De Pamphilis, M.L. (1979) Biochemistry 18, 4431-4443. Laver, W.G. (1970) Virology <u>41</u>, 488-500. Laver, W.G., Pereira, H.G., Russell, W.C. et Valentine, R.C. (1968) J. Mol. Biol. <u>37</u>, 379-386. Laver, W.G., Wrigley, N.G. et Pereira, H.G. (1969) Virology 38, 599-605. Lemay, P. (1978) Bul. Inst. Pasteur 76, 133-162. Lemay, P., Boudin, M.L., Milleville, M. et Boulanger, P. (1980) Virology 101, 131-143. Lemay, P. et Boulanger, P. (1980) Ann. Virol. (Inst. Pasteur) 131, 259-275. Low, B.W. et Richards, F.M. (1952) J. Am. Chem. Soc. 74, 1660-Luzzati, V. (1960) Acta Crystallogr. 13, 939-945. Luzzati, V., Tardieu, A., Mateu, L. et Stuhrmann, H.B. (1976) J. Mol. Biol. 101, 115-127. Maizel, J.V. Jr., White, D.O. et Sharff, M.D. (1968) Virology 36, 126-136. Martin. S.J. (1978)"The Biochemistry of viruses" Cambridge University Press.

Mautner, V. et Pereira, H.G. (1971) Nature 230, 456-457. McAllister, R.M., Nicholson, M.O., Reed, G., Kern, Je. Gilden, R.V. et Huebner, R.J. (1969) J. Natl. Cancer Inst. 43, 917-McPherson, A. Jr. (1976) J. Biol. Chem. 251, 6300-6303. McPherson, A. (1982) "Preparation and analysis of protein crystals" (J. Wiley and Sons, eds.) Wiley Interscience Publication, New York. Mirza, M.A. et Weber, J. (1982) Biochem. Biophys. Acta 696. 76-86. Morgan, C., Rosenkranz, H.S. et Mednis, B. (1969) J. Virol. 4, 777-796-Morin, N. et Boulanger, P. (1983) J. Virol. sous presse. Nermut, M.V. (1975) Virology 65, 480-485. Nermut, M.V. et Perkins, W.J. (1979) Micron 10, 247-266. Nermut, M.V. (1980) Arch. Virol. 64, 175-196. Nevins, J.R. et Chen-Kiang, S. (1981) Adv. Virus Res. 26, 1-35+ Norrby, E. (1966) Virology 28, 236-248. Norrby, E. et Shaaret, P. (1967) Virology 32, 489-502. Norrby, E. (1969a) Virology 37, 565-576. Norrby, E. (1969b) J. Gen. Virol. 5, 221-236. Pereira, H.G. et De Figueredo, M.V.T. (1962) Virology 18, 1-11. Pereira, H.G. et Skehel, J.J. (1971) J. Gen. Virol. 12, 13-24. Pereira, H.G. et Wrigley, N.G. (1974) J. Mol. Biol. 85, 617-631. Pereira, H.G., Huebner, R.J., Ginsberg, H.S. et Van der Veen, J. (1963) Virology 20, 613-622. Perricaudet, M., Westin, G., Le Moullec, J.M., Visser, L., Zabielski, J., Alestrom, P., Akusjarvi, G., Virtanen, A. et Pettersson, U. (1981) "Expression of Eucaryotic viral and cellular genôme" (Pettersson, R.F. ed.) pp 3-17-Academic Press, London. Pertoft, H., Laurent, T.C. et Seljelid, R. (1979) "Separation of cells and subcellular elements" (Peeters, H. ed.) pp 67-72. Pergamon Press, Oxford. Pettersson, U. (1971) Virology 43, 123-135. Pettersson, U. et Hoglund, S. (1969) Virology 39, 90-106.

- Pettersson, U., Philipson, L. et Hoglund, S. (1967) Virology 33, 575-590.
- Pfeiffer, P. et Dorne, B. (1971) Biochim. Biophys. Acta 288, 456-470.
- Philipson, L. (1979) Adv. Virus Res. 25, 357-405.
- Philipson, L., Lonberg-Holm, K et Pettersson, U. (1968) J. Virol. 2, 1064-1075.
- Philipson,L. et Pettersson,U. (1973)"Oncogenic adenoviruses"Progress in Experimental Tumor Research,Vol.18,pp1-55.(Karger Ed.)Basel.
- Pierce, J. et Suelter, C.H. (1977) Anal. Biochem. <u>81</u>, 478-480.
- Polasa, H. et Green, M. (1967) Virology 31, 565-567.
- Prage, N., Pettersson, U., Hoglund, S., Lonberg-Holm, K. et Philipson, L. (1970) Virology 42, 341-358.
- Prage, L., Pettersson, U et Philipson, L. (1968) Virology 36, 508-511.
- Rayment, I., Baker, T.S., Caspar, D.L.D. et Murakami, W.T. (1982) Nature 295, 110-115.
- Rekosh, D.M.K., Russell, W.C., Bellet, A.J.D. et Robinson, A.J. (1977) Cell 11, 283-295.
- Roberts, R.J., Arrand, J.R. et Keller, W. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3829-3833.
- Robinson, A.J. et Bellet, A.J.D. (1974) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39, 523-531.
- Rosen, L. (1960) Am. J. Hyg. 71, 120-128.
- Rosenwirth, B., Tjia, S., Wesphal, M. et Doerfler, W. (1974) Virology 60, 431-437.
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrot, R.H. et Ward, I.G. (1953) Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. <u>84</u>, 570-573.
- Russell, W.C. et Blair, G.E. (1977) J. Gen. Virol. 34, 19-35.
- Russell, W.C., McIntosh, K. et Skehel, J.J. (1971) J. Gen. Virol. <u>11</u>, 35-46.
- Saborio, J.L. et Oberg, B. (1976) J. Virol. 17, 865-875.
- Sergeant, A., Tigges, M.A. et Raskas, H.J. (1979) J. Virol. 29, 888-898.
- Simmons, T., Heywood, P. et Hodge, L.D. (1974) J. Mol. Biol. 89, 423-433.

Spector, T. (1978) Anal. Biochem. 86, 142-146. Stout, G.H. et Jensen, L.M. (1968) "X-ray Structure Determination" (Macmillan ed.) New York. Sung, M.T., Cao, T.M., Coleman, R.T. et Budelier, K.A. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2902-2906. Sung, M.T., Lischwe, M.A., Richards, J.C. et Hosokawa, K. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4981-4987. Sundquist, B., Everitt, E., Philipson, L. et Hoglund, S. (1973a) J. Virol. 11, 449-459. Sundquist, B., Pettersson, U., Thelander, L. et Philipson, L. (1973b) Virology 51, 252-256. Sussenbach, J.S. (1967) Virology 33, 567-574. Tate, V.E. et Philipson, L. (1979) Nucl. Acid Res. 6, 2769-2785. Thomas, C.A. (1954) J. Amer. Chem. Soc. 76, 6032-6034. Tibbetts, C. (1977) Cell 12, 243-249. Tibbetts, C. et Giam, C-Z. (1979) J. Virol. 32, 995-1005. Timmins, P.A. et Jacrot, B. (1983)" Neutron scattering in Molecular Biology" (Worcester, D.L. ed.) Elsevier-North Holland, Amsterdam, sous presse. Tjia, S., Fanning, E., Schick, J. et Doerfler, W. (1977) Virology 76, 365-379\* Tooney, N.M. et Cohen, C. (1977) J. Mol. Biol. 110, 363-385. Trentin, J.J., Yabe, Y. et Taylor, G. (1962) Science 137, 835-841-Valentine, R.C. et Pereira, H.G. (1965) J. Mol. Biol. 13, 13-20. Vayda, M.E., Rogers, A.E. et Flint, S.T. (1983) Nucl. Acid. Res. 11, 441-461. Van der Eb, A.J., Van Ormondt, H., Schrier, P.I., Lupker, J.H., Jochemsen, H., Van den Elsen, P.J., De Leys, R.J., Maat, J., Van Beveren, C.P., Dijkema, R. et De Waard, A. (1979) Cold Spring Harbe Sympe Quante Biole 44, 383-399. Van der Vliet et Levine (1973) Nature 246, 170-174. Van der Vliet, P.C. et Sussenbach, J.S. (1975) Virology 67, 415-426. Van der Vliet, P.C., Zandberg, J. et Jansz, H.S. (1977) Virology 80, 98-110.

- Van Holde, K.E. (1971) "Physical Biochemistry" (L. Hager et F. Wold eds.) Prentice Hall International, Inc. Londres.
- Unwin, P.N.T. et Henderson, R. (1975) J. Mol. Biol. <u>94</u>, 425-440.
- Westbrook, E.M. (1976) J. Mol. Biol. 103, 659-664.
- Wilcox, W.C. et Ginsberg, H.S. (1961) Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>47</u>, 512-
- Witz, J. (1983) Acta Crystallogr. (sous presse).
- Yamane, T. et Davidson, N. (1961) J. Amer. Chem. Soc. <u>83</u>, 2599-2607.
- Zaccai, G. et Jacrot, B. (1983) Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 12, 139-157.

