

50376  
1986  
39

50376  
1986  
39

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

Année 1986

N° d'ordre 33

THESE  
présentée à l'Université de Lille I  
pour l'obtention du titre de  
DOCTEUR de l'Université  
Spécialité : Biochimie

par

Nathalie MORIN

PROTEINE(S) D'ECHAFAUDAGE ET ASSEMBLAGE DE L'ADENOVIRUS 2



Présentée le 7 mars 1986 devant la Commission d'examen

JURY

Président : M. MONTREUIL  
Rapporteurs : M. D'HALLUIN  
M. JACROT  
Examineurs : M. BOULANGER  
M. KREMBEL

SCD LILLE 1



D 030 321153 3

50376  
1986  
39.



LA BROUETTE ou LES GRANDES  
INVENTIONS

Le paon fait la roue  
Le hasard fait le reste  
Dieu s'assoit dedans  
et l'homme le pousse

Jacques Prévert  
(Paroles)

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Unité de Virologie Moléculaire de l'INSERM à Lille.

Monsieur le Professeur Boulanger, vous m'avez initiée à la recherche dans un climat de travail détendu et résolument optimiste. Les résultats, que je présente ici, sont le fruit d'une étude qui n'a pu être réalisée que grâce à votre étroite collaboration. Je tiens à vous exprimer toute ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur Montreuil, vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

Messieurs les Professeurs Jacrot et Krembel, Monsieur le Docteur D'Halluin, vous avez accepté de juger ce mémoire, je vous en remercie vivement.

Parmi les membres de l'équipe de Virologie, j'aimerais souligner l'aide efficace que Jean Claude D'Halluin et Chantal Vercamer m'ont apportée lors de la réalisation à distance de ce manuscrit. Je voudrais les assurer de ma reconnaissance et de mon amitié.

J'aimerais également, sincèrement, remercier Mme Virginie Delecroy, qui s'est gentiment acquittée du rôle ingrat de dactylographe par correspondance de cette thèse.

## LEXIQUE

### 1- Cellules

AGMK :	cellules de rein de singe vert africain
CV <sub>1</sub> :	lignée établie d'AGMK
HEK :	cellules embryonnaires de rein humain
HEK 293 :	cellules HEK transformées par l'adénovirus de type 5 et contenant l'extrémité gauche du génome (du 270 au 4123e nucléotide)
HeLa :	cellules humaines en lignée continue, provenant d'un carcinome épithélial du col utérin
KB :	cellules humaines en lignée continue, provenant d'un carcinome de plancher buccal

### 2- Autres abréviations

aa :	acides aminés
Ad2 WT :	adénovirus type 2 souche sauvage (Wild Type)
Asp :	acide aspartique
Arg :	arginine
Apex :	zones apicales des icosaoédres viraux, comprenant le penton complet et les hexons péripentonaux
CH :	cycloheximide
CsCl :	chlorure de césium
DBP :	DNA Binding Protein (protéine se liant à l'ADN monocaténaire)
DFP :	diisopropyl fluorophosphate
DMTB :	dimethyl dithiobisbutyrimidate : agent de pontage entre protéines
CON :	groupe de 9 hexons (hexons des faces)
Glu :	acide glutamique
h :	heure
hpi :	heure post-infection
IM :	intermédiaires d'assemblage
JV :	jeunes virions
K :	kilodaltons
MM :	masse moléculaire

mn :	minute
PAGE SDS :	électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (sodium dodecyl sulfate)
pTP :	précurseur de la protéine terminale
TP :	protéine terminale
S :	coefficient de Svedberg
<u>ts</u> :	thermosensible
Température Permissive :	33° C
Température restrictive :	39.5° C
UG :	unité génome

- tous les renseignements sont donnés pour Ad2 sauf spécification
- le génome viral est divisé arbitrairement en 100 UG

## TABLE DES MATIERES

GENERALITES	p1
I- <u>GENERALITES</u>	p1
A- <u>Classification</u>	p1
B- <u>Morphologie</u>	p1
1- <u>La Capside</u>	p1
2- <u>L'ADN viral</u>	p1
C- <u>Les différents cycles viraux</u>	p3
1- <u>Le cycle abortif</u>	p3
2- <u>Le cycle transformant</u>	p3
3- <u>Le cycle lytique</u>	p4
II- <u>CYCLE LYTIQUE</u>	p4
A- <u>Pénétration du virus dans la cellule hôte</u>	p4
B- <u>Organisation des gènes précoces</u>	p7
1- <u>Généralités</u>	p7
2- <u>La région E1</u>	p7
a) La zone E1A	p7
b) La zone E1B	p9
c) Le rôle des protéines de E1 dans la transformation cellulaire	p9
3- <u>La région E2</u>	p9
a) La zone E2A	p10
a) Régulation d'expression	p10
β) Transformation	p10
γ) Rôle dans l'assemblage	p10
b) La zone E2B	p11
4- <u>La région E3</u>	p11
5- <u>La région E4</u>	p11
C- <u>Réplication</u>	p12
1- <u>Initiation de la réplication</u>	p12
2- <u>L'élongation</u>	p13
D- <u>Phase tardive</u>	p13
1- <u>Unité de transcription tardive</u>	p13
a) Le promoteur majeur tardif	p13

b)	Rôle précoce du promoteur majeur tardif	p17
c)	Les ARNm ne dépendant pas du MLP	p17
a)	L'ARNm du polypeptide IX	p17
β)	L'ARNm du polypeptide IVa <sub>2</sub>	p17
d)	Les ARN viraux associés (VA-RNAs)	p17
2-	<u>Polypeptides tardifs : structures et propriétés</u>	p18
a)	Introduction	p18
b)	L'hexon	p18
c)	Le penton	p20
a)	La base du penton	p21
β)	La fibre	p21
d)	Le polypeptide IIIa	p22
e)	Le polypeptide VI	p22
f)	Le polypeptide VIII	p23
g)	Le polypeptide IX	p23
h)	Les protéines du nucléoïde	p23
a)	Le polypeptide VII	p24
β)	Le polypeptide V	p24
γ)	Le polypeptide μ	p24
δ)	Structure générale du nucléoïde	p25
i)	Les polypeptides X-XII	p25
3-	<u>Polypeptides tardifs non structuraux</u>	p26
a)	Le polypeptide IVa <sub>2</sub> -50 K	p26
b)	La 100 K et la 33 K	p26
a)	La protéine 100 K	p26
β)	33 - 39 K	p27
c)	La protéase virale : 23 K	p27
d)	Les autres protéines non structurales	p28
E-	<u>Mécanismes communs aux assemblages viraux</u>	p28
1-	<u>Les capsides virales : leur structure</u>	p28
2-	<u>Mode d'assemblage viral : le bactériophage P22</u>	p29
a)	Généralités	p29
b)	Les règles de l'assemblage	p31
c)	Formation de la précapside virale	p31
d)	Empaquetage de l'ADN	p33
e)	Assemblage de la queue du phage P22	p34
3-	<u>Assemblage de l'adénovirus</u>	p34
a)	Introduction	p34

b)	Assemblage des capsomères	p34
a)	L'hexon	p34
β)	Le penton	p36
c)	Les groupes de 9 hexons	p36
d)	Essais d'assemblage de capsides vides "in vitro"	p38
e)	Les capsides vides	p38
f)	Intermédiaires lourds	p40
g)	Insertion de l'ADN viral	p40
h)	Les jeunes virions	p40
i)	Conclusion	p41

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

1-	<u>Culture cellulaires et virales</u>	p43
2-	<u>Isolement et purification de différentes particules</u>	p43
3-	<u>Conditions de marquage</u>	p44
a)	Marquage avec différents acides aminés marqués	p44
b)	Marquage à l'acide phosphorique <sup>32</sup> P	p44
c)	Marquage à l'acétate <sup>14</sup> C	p45
4-	<u>Rupture des particules virales - Isolement des sous structures</u>	p45
5-	<u>Dissolution des gels d'acrylamide et comptage de l'incorporation</u>	p45
6-	<u>Méthodes biochimiques générales pour la caractérisation de H2 ts</u>	p46
	<u>107</u>	
a)	Assemblage des hexons trimères	p46
b)	Composition peptidique de la 100 K et de la 90 K	p46
7)	<u>Techniques pour la caractérisation de H2 ts 107</u>	p46
a)	Complémentation peptidique de la 100 K et de la 90 K	p46
b)	Recombinaison	p46
c)	Technique de marqueur rescue	p47
d)	Séquençage de l'ADN par la méthode des dideoxy	p47
8)	<u>Réalisation de tests immunologiques</u>	p47
9)	<u>Tests d'immunofluorescence</u>	p48
10)	<u>Chromatographie d'affinité</u>	p48
a)	Préparation du matériel pour les colonnes d'affinité	p48
b)	Synthèse de l'hexon sépharose	p48
c)	Synthèse de la novobiocine sépharose	p49



TRAVAUX PERSONNELS	p50
I- <u>INTRODUCTION</u>	p50
II- <u>ASSEMBLAGE DES PARTICULES</u>	p50
A- <u>Etudes préliminaires</u>	p50
B- <u>Cinétique d'incorporation de protéines virales dans la capsid</u> <u>d'adénovirus</u>	p51
1- Répartition du marquage dans les sous-structures des capsides	p51
a) Analyse des populations virales matures	p52
b) Analyse des intermédiaires d'assemblage	p52
2- Analyse polypeptidique des sous-structures virales	p52
a) Analyse des protéines marquées de la population virale, de densité 1,34, aux différents points de prélèvement	p54
b) Analyse des protéines marquées dans les populations de capsides vides, aux différents points de prélèvement	p54
C- <u>Processus d'assemblage de H2 ts 112</u>	p57
1- Double synchronisation du système d'infection	p57
2- Evolution des polypeptides marqués des particules H2 <u>ts</u> 112 lors du blocage à la cycloheximide et de la variation de température	p60
D- <u>Mise en évidence de l'incorporation différentielle de la radioactivité</u> <u>dans les 2 espèces d'IM de H2 ts 107</u>	p60
III- <u>CARACTERISATION DE L'H2 ts 107 - ROLE DE LA PROTEINE</u> <u>D'ECHAFAUDAGE</u>	p64
A- <u>Première caractérisation de l'H2 ts 107</u>	p64
1- Complémentation	p64
2- La trimérisation de l'hexon et son transport du cytoplasme au noyau	p65
B- <u>Caractérisation génétique de la mutation du H2 ts 107</u>	p67
1- Recombinaison	p87
2- Sauvetage de la mutation par des fragments d'ADN extraits de la souche sauvage de l'adénovirus	p69
3- Séquençage par la méthode "des didéoxy"	p69
4- Conclusions	p70

C-	<u>Communautés entre la 100 K et la 90 K</u>	p70
1-	Communautés structurales	p70
	- phosphorylation	
	- 1ère précipitation antigénique	
	- N-acétylation	
2-	Communautés immunologiques	p72
D-	<u>Importance de la 100 K et de la 90 K dans l'échafaudage des particules</u>	p75
1-	Affinité de la 100 K pour les trimères d'hexons	p75
2-	Topographie de la 100 K et de la 90 K dans les IM d'H2 <u>ts</u> 107	p76
E-	<u>Intervention de la 100 K dans l'encapsidation de l'ADN</u>	p79

DISCUSSION - CONCLUSION p82

BIBLIOGRAPHIE p87

ANNEXES p114

GENERALITES

## I- GENERALITES

### A- Classification (Tableau 0)

Les adénovirus sont des virus à ADN, non enveloppés, de forme icosaédrique. Ils furent mis en évidence par Rowe en 1953 dans les tissus amygdaliens.

Ils sont responsables de troubles respiratoires (HILLEMANN and WERNER, 1954), de kératoconjunctivites et de gastroentérites (FLEWET et al., 1975 ; FADEN et al., 1978).

Les 41 sérotypes humains actuellement identifiés sont répartis en 7 sous groupes (de JONG et al., 1983).

Leur classification découle de plusieurs de leurs propriétés :

- leur pourcentage en bases G+C (PINA and GREEN, 1965),
- la longueur de leur fibre (NORRBY, 1967),
- leurs propriétés d'hémagglutination (ROSEN, 1958),
- le degré d'homologie de leur ADN (GREEN et al., 1979),
- leur pouvoir oncogène chez le hamster nouveau-né (HUEBNER, 1967).

### B- Morphologie

#### 1- La capsid (Cf. Fig. 1)

La capsid virale a un diamètre de 65 à 80 nm (HORNE et al., 1959). Elle est composée de 87 % de protéines et 13 % d'ADN (GREEN and PINA, 1963). Les 20 faces de cet icosaèdre sont constituées de 240 capsomères appelés hexons. Les capsomères de chaque sommet, de symétrie pentagonale, sont appelés pentons ; ceux-ci sont composés de la base du penton prolongée de la fibre.

#### 2- L'ADN viral

Il a une masse moléculaire approximative de  $23 \cdot 10^6$ , légèrement variable suivant le sérotype.

Ses 36000 paires de bases rassemblent l'information génétique du virion. Le génome viral a été divisé arbitrairement en 100 unités génome.

L'ADN viral sédimente à 34 S en gradient de saccharose alcalin.

La molécule d'ADN est bicaténaire, linéaire, à chacune de ses extrémités

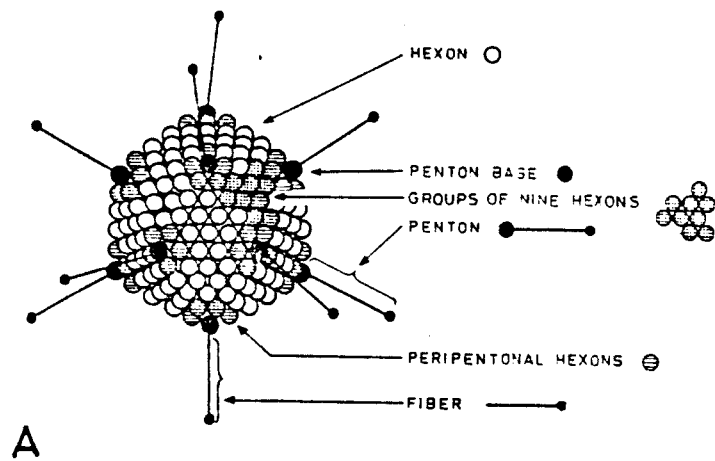


Figure 1 : Structure de la capside d'adénovirus d'après PHILIPSON et PETERSSON (1973)

Tableau 0 : Propriétés des sous-groupes d'adénovirus humains

Sous-groupes	Sérotype	ADN % d'homologie (a)	% G + C	modèle d'hémagglutination (b)	longueur de la fibre (en nm)	Oncogénicité chez le hamster nouveau-né
A	12,18,31	48-69 (8-20)	48	IV	28-31	(en 4 mois)
B	3,7,11, 14,16,21, 34,35	89-94 (9-20)	51	I	9-11	Faible (en 4 à 18 mois)
C	1,2,5,6	99-100 (10-16)	58	III	23-31	Nulle
D	8,9,10, 13,15,17 19,20,22 23,24,25 26,27,28 29,30,32 33,36,37, 38,39	94-99 (4-17)	58	II	12-13	Nulle
E	4	(4-23)	58	III	17	Nulle
F	40	n.d.	n.d.	IV	28-33	Nulle
G	41	n.d.	n.d.	IV	28-33	Nulle

n.d. : non déterminé

(a) : pourcentage d'homologie dans le sous-groupe. Les nombres entre parenthèses indiquent le pourcentage d'homologie par rapport aux membres des autres sous-groupes.

(b) : I-Agglutination complète des érythrocytes de singe. II-Agglutination complète des érythrocytes de rat. III-Agglutination partielle des érythrocytes de rat. IV-Agglutination des érythrocytes de rat, visible seulement après addition d'antisera hétérotypiques.

Tire de WADELL, G., 1984, Molecular epidemiology of human adenovirus.  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 110, 191-220





Tableau 1 : Permissivité des cellules de différentes espèces pour les adénovirus humains  
DELSERT et D'HALLUIN (1984)

Sous groupe (sérotipe représentatif)	Cellules humaines		Cellules simiennes		Cellules de hamsters			
	KB ou HeLa	CV1	BHK	BHK	BHK	BHK		
Expression			Expression			Expression		
Transcription			Transcription			Transcription		
précoce			précoce			précoce		
Réplication			Réplication			Réplication		
Traduction			Traduction			Traduction		
A (31)	+++	++	0	?	?	0	0	0
B (3,7)	+++	++	0	?	++	0	0	U
C (2,5)	+++	++	++	++	++	++	++	++
D (4)	+++	+	+	?	?	?	?	?
E (9)	+++	+	++	?	?	?	?	?
			pas d'assemblage					

existe une séquence terminale inversée d'une centaine de paires de bases (ARRAND and ROBERTS, 1979), que l'on retrouve très conservée dans l'ensemble des différents sérotypes.

Une protéine de 55 K, la protéine terminale (TP), liée de façon covalente à chaque extrémité 5' du ADN permet sa circularisation (REKOSH et al., 1977).

Dans la capside, la molécule d'ADN est associée à des protéines basiques qui lui confèrent une structure voisine de celle des nucléosomes, appelée nucléoïde virale.

### C- Les différents cycles viraux

#### 1- Le cycle abortif (Cf. Tableau 1)

Le virus exprime partiellement son information. Souvent la réplication de l'ADN n'a pas lieu, il n'y a jamais de progéniture virale. Les adénovirus humains développent, par exemple, de tels cycles dans les cellules de singes telles que les CV1 (KLESSIG and ANDERSON, 1975).

#### 2- Le cycle transformant

Le pouvoir oncogène de l'adénovirus fut mis en évidence chez le hamster nouveau-né (HUEBNER et al., 1962). Néanmoins, seuls les adénovirus des sous-groupes A (tel que l'Ad12), et B (tel que l'Ad3), possèdent cette capacité d'induire des tumeurs.

Par contre, tous les sérotypes d'adénovirus sont capables de transformer des cellules de rats embryonnaires "in vitro". La transformation se traduit par l'immortalisation de la culture cellulaire et l'acquisition de caractères particuliers.

La transformation ne peut se produire qu'en l'absence de la multiplication du virus. Ainsi, les sérotypes d'adénovirus 2 et 5 (sous-groupe C), se répliquant sur cellules de hamster, ne peuvent les transformer. Néanmoins, des mutants thermosensibles de ces sérotypes transforment efficacement ces mêmes cellules (WILLIAMS, 1973).

L'initiation et le maintien de la transformation par immortalisation des cellules en culture sont réalisés par l'extrémité gauche du génome de l'adénovirus (GRAHAM et al., 1974a,b).



### 3- Le cycle lytique (Cf. Fig. 2)

Il aboutit à la lyse cellulaire et à la libération d'une grande quantité de particules virales. L'adénovirus exprime alors la totalité de son information génétique.

Le cycle lytique se divise en plusieurs étapes qui vont de la pénétration du virus dans la cellule, l'expression de ses gènes précoces (phase précoce), la réplication de son ADN, l'expression de ses gènes tardifs, et enfin à l'assemblage de ses protéines tardives en de nouvelles unités infectieuses.

Le cycle viral dure environ 30 heures.

L'assemblage ne s'effectuant que lors du cycle lytique normal, nous n'étudierons en détail que ce cycle.

## II- CYCLE LYTIQUE

### A- Pénétration du virus dans la cellule hôte (Cf. Fig. 3)

L'adénovirus se fixe par l'intermédiaire de ses fibres à des récepteurs spécifiques de la membrane cellulaire (LONDBERG-HOLM and PHILIPSON, 1969).

Le récepteur cellulaire est un complexe de trois polypeptides de masses moléculaires 78, 42 et 34 K qui fut purifié par chromatographie d'affinité (HENNACHE and BOULANGER, 1977).

L'adénovirus pénètre dans la cellule, probablement, par un phénomène de pinocytose (CHARDONNET and DALES, 1970). Il perd, lors de cette étape, ses pentons (PHILIPSON et al., 1968). Puis progressivement ses protéines, parallèlement sa sensibilité à la DNase augmente. Le mécanisme de transport du virus dans le cytoplasme fait intervenir le réseau de microtubules (LUFTIG and WEIHING, 1975 ; BELIN and BOULANGER, 1985). Lors de l'infection virale des cellules en présence de vinblastine, substance dont l'action sur la cellule provoque la formation d'un complexe de tubuline périnucléaire, les particules sans pentons ne peuvent atteindre le noyau (LYON et al., 1978).

PHILIPSON et al. (1968) montrèrent que l'ADN viral pénètre le noyau de la cellule après que la particule ait perdu la majorité des protéines virales dans le cytoplasme. Les protéines du nucléoïde sont alors remplacées par des histones cellulaires, formant une structure semblable à celle de la chromatine (chromatine like) (SERGEANT et al., 1979 ; TATE and PHILIPSON, 1979 ; VAYDA et al., 1983).

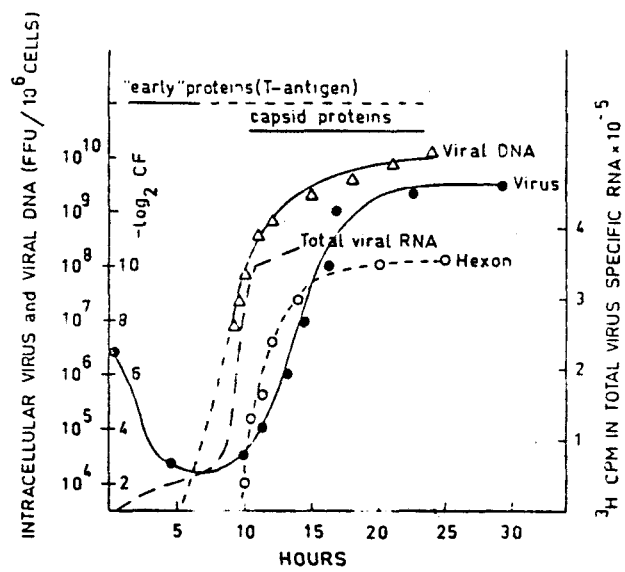


Figure 2 : Courbes de croissance de l'Adénovirus 2 dans une culture de cellules KB en suspension d'après PHILIPSON et LINDBERG (1974)

- concentration de virus dans les cellules
- quantité d'hexon antigénique formé
- △—△ synthèse de l'ADN viral
- ARN viraux spécifiques

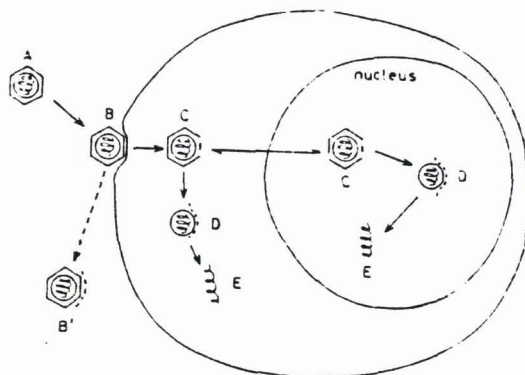


Figure 3 : Représentation schématique de la pénétration de l'adénovirus 2 dans la cellule, pendant les 2 premières heures d'infection d'après LONDBERG-HOLM et PHILIPSON (1969).

- A- virion infectieux
- B- attachement du virus au récepteur cellulaire
- C- virus, dans le cytoplasme, ayant perdu ses régions apicales
- D- pénétration des nucléoïdes dans le noyau

## B- Organisation des gènes précoces

### 1) Généralités (Cf. Fig. 4)

Cinq régions s'expriment avant la réplication de l'ADN viral. Les zones E1A, E1B et E3 sont portées par le brin r, alors que les zones E2 et E4 sont codées par le brin l (Cf. Fig. 4).

Leur expression varie au cours du cycle. La région E1A est transcrite peu après l'infection, tandis que les zones E1B et E3 sont plus tardives. Enfin, la zone E2 s'exprime tout au long du cycle lytique.

### 2) La région E1

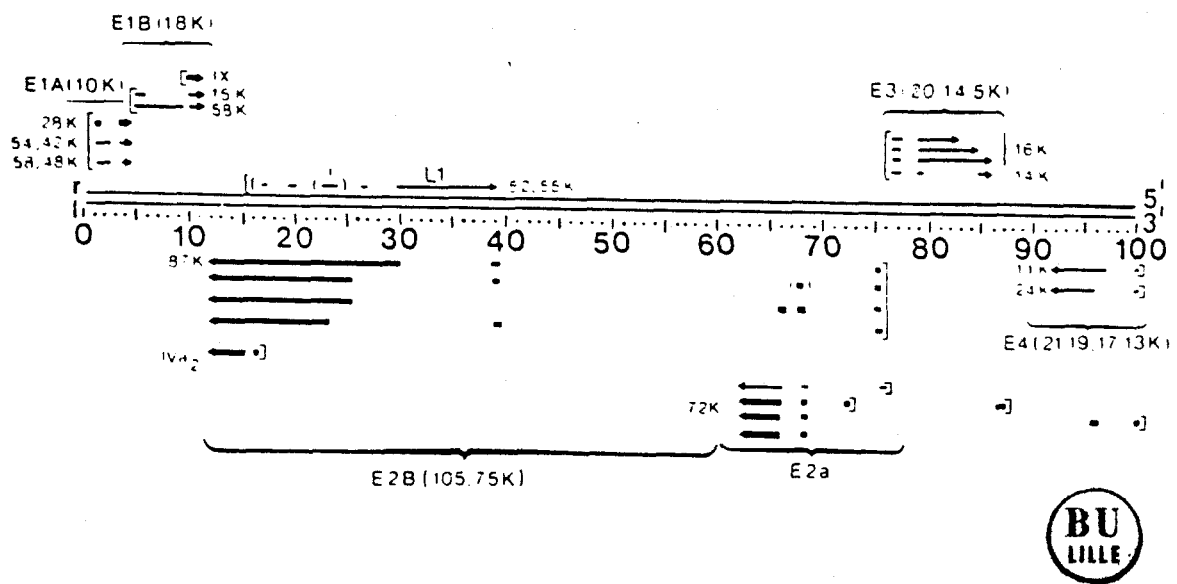
Cette région située à l'extrémité gauche du génome entre 0 et 12 UC est divisée en trois zones transcriptionnelles (CHOW et al., 1977 ; BERK et al., 1979) appelées E1A, E1B et l'unité de transcription du polypeptide IX.

#### a) La zone E1A

La zone E1A (0 - 4,5 UC) est transcrite en trois ARNm, ayant des extrémités 3' et 5' identiques mais des épissages différents. Les ARNm 12 S et 13 S codent pour deux protéines de 289 et 243 AA (PERRICAUDET et al., 1979). La traduction "in vitro" de ces ARNm met en évidence en gel de polyacrylamide SDS des polypeptides de masses moléculaires allant de 42 à 53 K. L'ARNm 13S code pour deux protéines de 53 K et 44 K en gel de polyacrylamide SDS. L'ARNm 12 S est traduit en deux polypeptides de 47 K et 35 K (HARTER and LEWIS, 1978). Enfin, le messenger 9S, qui n'est exprimé que pendant la phase tardive code pour un polypeptide de 6 K (VIRTANEN and PETTERSSON, 1983).

Les produits de l'ARNm 13 S contrôlent positivement le taux de transcription des autres régions précoces et de la région L1 (NEVINS, 1981). L'action d'une substance, l'anisomycine, inhibant les synthèses protéiques révèle que E2 et E3 sont les régions les plus dépendantes des produits de E1A (SHAW and ZIFF, 1982).

E1A est également responsable du pouvoir transformant de l'adénovirus comme nous le verrons plus loin.



**Figure 4 :** Carte du génome de l'adénovirus 2 représentant les régions précoces et leurs ARN messagers d'après RICHARDSON et WHESTEPHAL (1981).  
- les crochets désignent la localisation des promoteurs  
- les lignes pointillées représentent les épissages des ARN  
- les flèches représentent le sens de la transcription

b) La zone E1B

Cette zone est localisée entre 4,6 et 12 UG. Deux ARNm de 22 S et 13 S sont exprimés précocément (lors de l'infection) à partir d'un promoteur commun (PERRICAUDET et al., 1979).

Le messager 22 S code pour une phosphoprotéine de 58 K (GILEAD et al., 1976 ; SCHRIER et al., 1979). Il semble que le messager 13 S ne code que pour le polypeptide 19 K. La région codante de la 58 K chevauche celle de la 19 K. Néanmoins chez l'Ad12 et l'Ad5 (BOS et al., 1981), il n'existe pas de peptides tryptiques communs entre ces deux protéines qui sont vraisemblablement codées dans des cadres de lecture différents.

La région E1B code également pour le polypeptide IX que l'on retrouve associé à la capsid au stade tardif. Son ARNm s'exprime précocement, et n'est pas épissé (ALESTROM et al., 1980). Il recouvre une partie de la séquence non-codante des messagers 22 S et 13 S (GINGERAS et al., 1982). Le rôle du polypeptide IX sera détaillé dans le chapitre traitant de la structure de la capsid.

c) Le rôle des protéines de E1 dans la transformation cellulaire

- Le pouvoir oncogène de l'adénovirus fut mis en évidence chez le hamster nouveau-né par HUEBNER et al., (1962).

- La transformation cellulaire se déroule en deux phases :

. D'une part, l'immortalisation des cellules primaires, accompagnée de la modification de leur morphologie, est induite par l'expression de la zone E1A (HOUWELING et al., 1980 ; van den ELSEN et al., 1983a).

. D'autre part, la transformation proprement dite, caractérisée par l'apparition de colonies cellulaires poussant en multicouches, nécessite la protéine 15 K de la zone E1B (van den ELSEN et al., 1983b). Le polypeptide 58 K de cette même zone est responsable du phénotype des cellules capable d'induire des tumeurs chez l'animal (BERNARDS et al., 1983).

3- La région E2

Elle s'étend de 75 à 11 UG sur le brin I du génome (sens droite-gauche ←) et contient deux unités transcriptionnelles E2A et E2B.

a) La zone E2A

- située entre 66,5 et 61,6 UG (BAKER et al., 1979), son seul produit est un polypeptide de 72 K de masse moléculaire apparente.

Son ARNm est produit à la fois pendant la phase précoce et la phase tardive mais à partir de deux promoteurs différents.

La 72 K est une protéine multifonctionnelle qui possède une très haute affinité pour l'ADN monocaténaire. Elle intervient dans différents mécanismes notamment :

α) Régulation d'expression

- La 72 K autorégule sa propre production (CARTER and JENSEN-BLANTON, 1978).

- Elle réprime, probablement au niveau transcriptionnel, la zone E4 "in vitro" (HANDA et al., 1983) et "in vivo" (NEVINS and WINKLER, 1980).

- Elle régule la stabilité des ARNm de la zone E1 (BABICH and NEVINS, 1981).

β) Transformation

H5 ts 125, mutant thermosensible dans le gène de la 72 K, possède une efficacité de transformation de l'ordre de 5 fois supérieure à celle rencontrée chez le virus sauvage (GINSBERG et al., 1974 ; LOGAN et al., 1981). La 72 K agit probablement à ce niveau par un mécanisme indirect impliquant sa régulation négative de la zone E1.

γ) Rôle dans l'assemblage

La 72 K possède un rôle au niveau de l'assemblage des particules (NICOLAS et al., 1983). Ces auteurs ont isolé le double mutant H5 r (ts 107) 202, affecté sur le gène de la 72 K. Ce mutant a une croissance indépendante de la température dans les cellules HeLa, par contre son expression dans les cellules 293 (cellules HEK, transformées par l'adénovirus 5 et contenant son extrémité gauche) est thermosensible. En effet, dans ces cellules, le taux de synthèse de son ADN à température restrictive (39°5) est 2 à 3 fois inférieur à celui du type sauvage. Bien qu'il accumule alors des quantités de protéines tardives normales, l'assemblage n'a pas lieu. Ce double

mutant reflète également le rôle de la 72 K, par son interaction avec des fonctions cellulaires, dans le phénomène de dépendance vis-à-vis de l'hôte.

#### b) La zone E2B

Cette région étendue est sous le contrôle des promoteurs de E2A.

Les deux protéines codées dans cette zone sont :

- le précurseur de la protéine terminale, pTP, qui a une masse moléculaire de 87 K et subit lors de la phase tardive un clivage protéolytique (CHALLBERG and KELLY, 1981) pour former une protéine de 55 K.

- l'ADN polymérase virale codée entre 24 et 14 UG qui a une masse moléculaire de 140 K. On la retrouve étroitement associée au précurseur de la protéine terminale dans les extraits de cellules infectées (LICHY et al., 1982).

Les fonctions de ces deux protéines seront détaillées dans le chapitre traitant de la réplication.

#### 4- La région E3

Cette zone s'étend de 75,9 à 86 UG. Les nombreuses espèces d'ARNm déjà décrites (BERK and SHARP, 1978 ; CHOW et al., 1979) peuvent être transcrites à partir du promoteur propre de cette zone (EVANS et al., 1977) ou à partir du promoteur majeur tardif.

Les trois cadres de lecture sont utilisés par le codage de protéines.

Quatre protéines codées par la région E3 ont été mises en évidence, elles ont des masses de 13 K, 14 K, 15,5 K et 19 K.

Le polypeptide de 19 K est en fait une glycoprotéine que l'on retrouve associée à la fraction membranaire des cellules infectées (PERSSON et al., 1979a).

Des mutants de délétion dépourvus de la totalité de la zone E3 ont une croissance normale dans les cellules en culture. Les produits de la zone E3 ne sont pas indispensables à l'expression de l'adénovirus dans les cultures cellulaires.

#### 5- La région E4

Elle se situe à l'extrémité droite du génome entre 99 et 91 UG. Les trois cadres de lecture ont des régions codantes (HERISSE et al., 1981).



La traduction "in vitro" d'ARNm sélectionnés (LEWIS et al., 1976) a permis de mettre en évidence des protéines, dont les masses moléculaires apparentes sont 24, 21, 19, 17 et 11 K.

Le polypeptide 24 K a une masse moléculaire réelle de 34 K (SARNOW et al., 1984), on le retrouve associé à la 58 K de E1B. Un mutant de délétion de cette zone, l'H5 dl 355, viable, voit sa production virale réduite d'un facteur 50 par rapport à celle du type sauvage. Il réplique son ADN, mais transcrit peu de messagers tardifs. De plus, il inhibe peu les synthèses cellulaires. Ces caractères de croissance sont communs à ceux des mutants de délétion de la 58 K de E1B (SARNOW et al., 1984).

H5 dl 366, possédant une délétion plus grande dans la zone E4, a le même phénotype que H5 dl 355. Cependant, il est plus déficient et ne peut croître que dans les cellules exprimant la zone E4 (HALBERT et al., 1985).

Le polypeptide de 11 K est associé à la matrice nucléaire. Le mutant H5 dl 341, délété dans la zone codante de ce polypeptide, réplique néanmoins son ADN de façon normale et est viable (SARNOW et al., 1982).

## C- Réplication

Le démarrage de la réplication de l'ADN viral ponctue le passage de la phase précoce à la phase tardive. Pendant la phase tardive, la synthèse de l'ADN cellulaire est réduite de 90 %.

La réplication de l'adénovirus suit un mécanisme de déplacement de brin (SUSSENBACH et al., 1972), elle peut débiter à chaque extrémité de la molécule d'ADN (ARRAND and ROBERTS, 1979).

### 1- Initiation de la réplication

Chaque extrémité de la molécule d'ADN est liée de façon covalente à la protéine terminale par un pont phosphodiester entre le résidu déoxycytidilique 5' terminal et une sérine de la protéine terminale (DESIDERIO and KELLY, 1981).

Lors de la réplication, le complexe pTP-DNA polymérase reconnaît une séquence hautement conservée entre la 9e et la 22e paire de bases à l'extrémité du génome. Un dCMP s'apparie à un résidu dG proche de la zone 9-22 paires de bases du brin matrice. L'ADN polymérase virale catalyse alors la réaction de liaison covalente entre le pTP et le premier nucléotide (dCMP) apparié de la chaîne (STILLMAN et al., 1982). Le complexe pTP-dCMP ainsi formé sert

d'amorce à la réaction d'élongation. Une protéine cellulaire de 47 K (NAGATA et al., 1982) stimule l'initiation de la réplication (Cf. Fig. 5).

La maturation du pTP par clivage protéolytique n'est réalisée que pendant la phase tardive.

## 2- L'élongation (Cf. Fig. 6)

La protéine 72 K de la zone E2A, par son affinité pour l'ADN monocaténaire, permet la fusion de l'ADN bicaténaire (CHALLBERG et al., 1980 ; FRIEDFELD et al., 1983). L'étude du mutant thermosensible H5 ts 125 permet de démontrer que seule la partie C-terminale de la 72 K est nécessaire à la réaction d'élongation (FRIEDFELD et al., 1983).

Chez l'adénovirus, l'élongation de la chaîne d'ADN est peu dépendante de la concentration en ATP (de JONG et al., 1983). La sensibilité très importante de la polymérase virale aux 2'-3' ddNTP est comparable à celle de la polymérase  $\alpha$ . Par contre l'aphidicoline n'inhibe la réaction d'élongation de l'ADN viral qu'à des concentrations de l'ordre de 3 à 400 fois supérieures à celle requise pour l'inhibition de l'ADN polymérase cellulaire de type  $\alpha$ .

## D- Phase tardive

### 1- Unité de transcription tardive

#### a) Le promoteur majeur tardif (Cf. Fig. 7)

Dès le début de la réplication de l'ADN viral commence la transcription des gènes tardifs qui sont principalement localisés sur le brin r à droite du promoteur majeur tardif à 16,6 UG (EVANS et al., 1977). Elle permet la formation d'un ARN précurseur nucléaire de 28 S. L'ARN précurseur produit 5 familles d'ARNm appelées L1, L2, L3, L4, L5, possédant en commun trois séquences de tête situées aux positions 16,6 ; 19,6 et 26,6 UG sur le brin r et constituées de 200 nucléotides (BERGET et al., 1977).

A l'intérieur de chaque famille, les ARNm de taille variable ont une extrémité 3' commune (CHOW et al., 1977 ; BERGET and SHARP, 1979).

Dix-huit espèces de messagers sont transcrites à partir du promoteur majeur tardif. Celui de la région L5, codant pour la fibre possède trois séquences de tête x, y, z, en plus des séquences communes à tous les ARN tardifs.

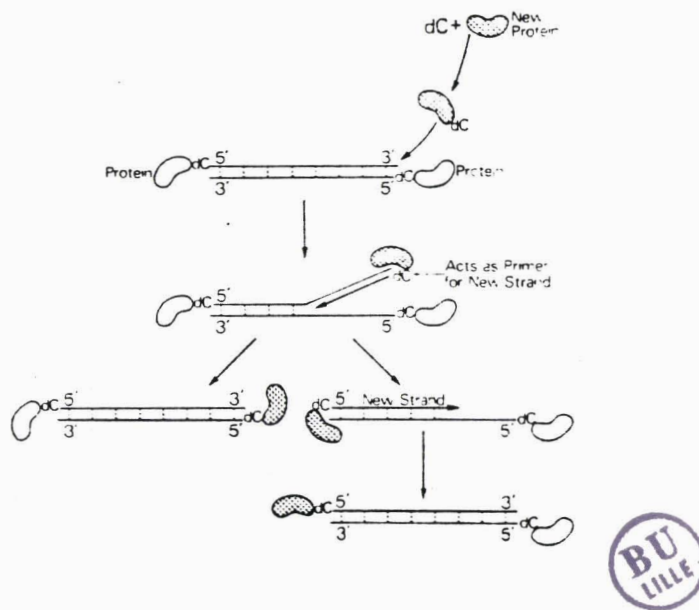
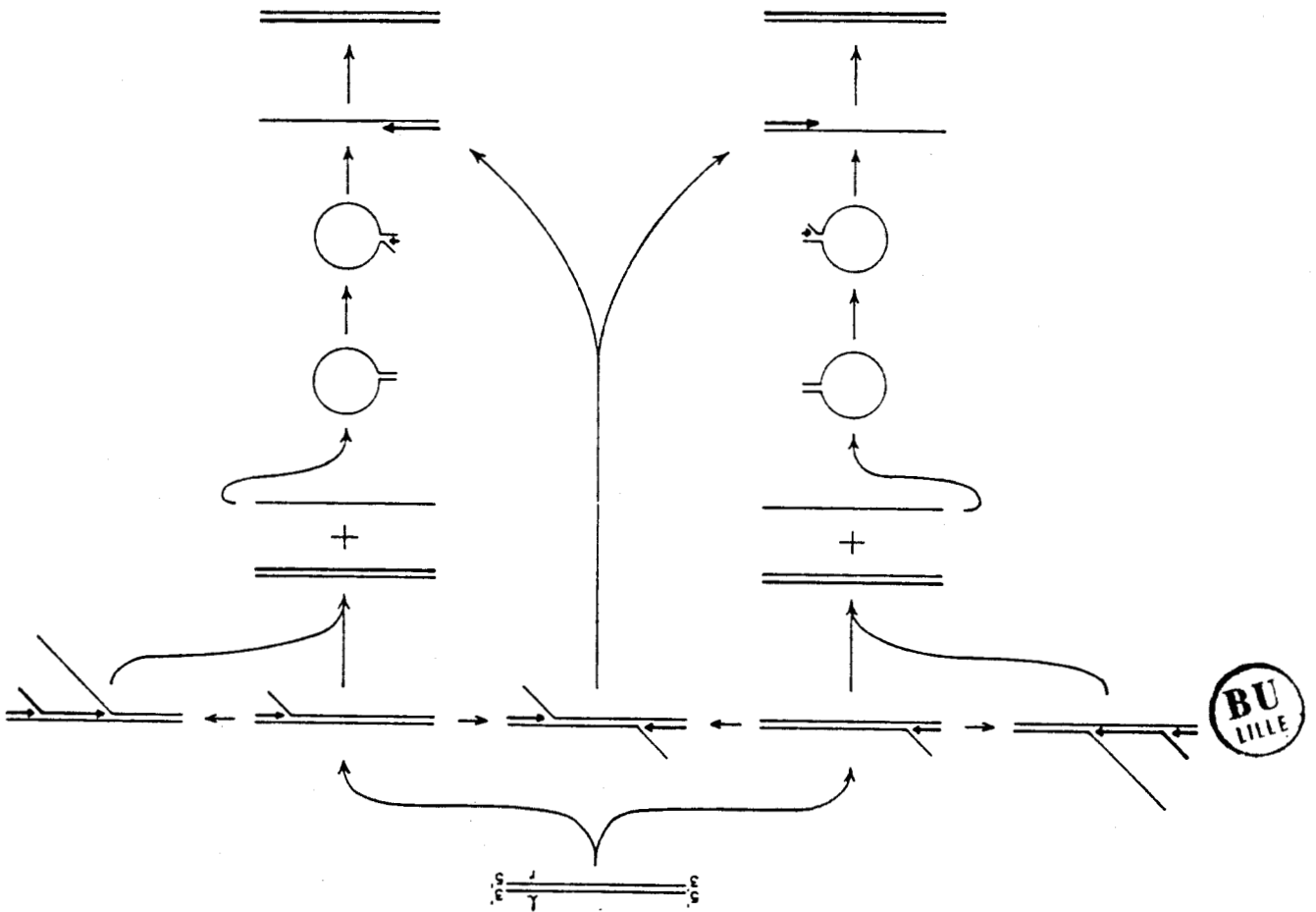
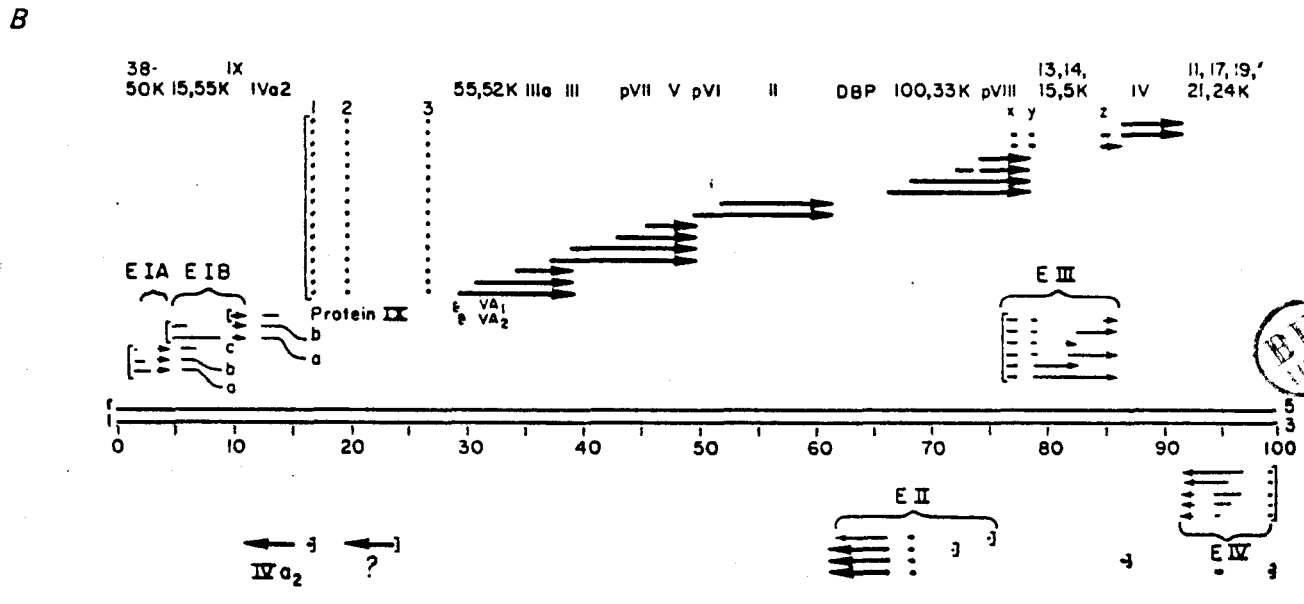
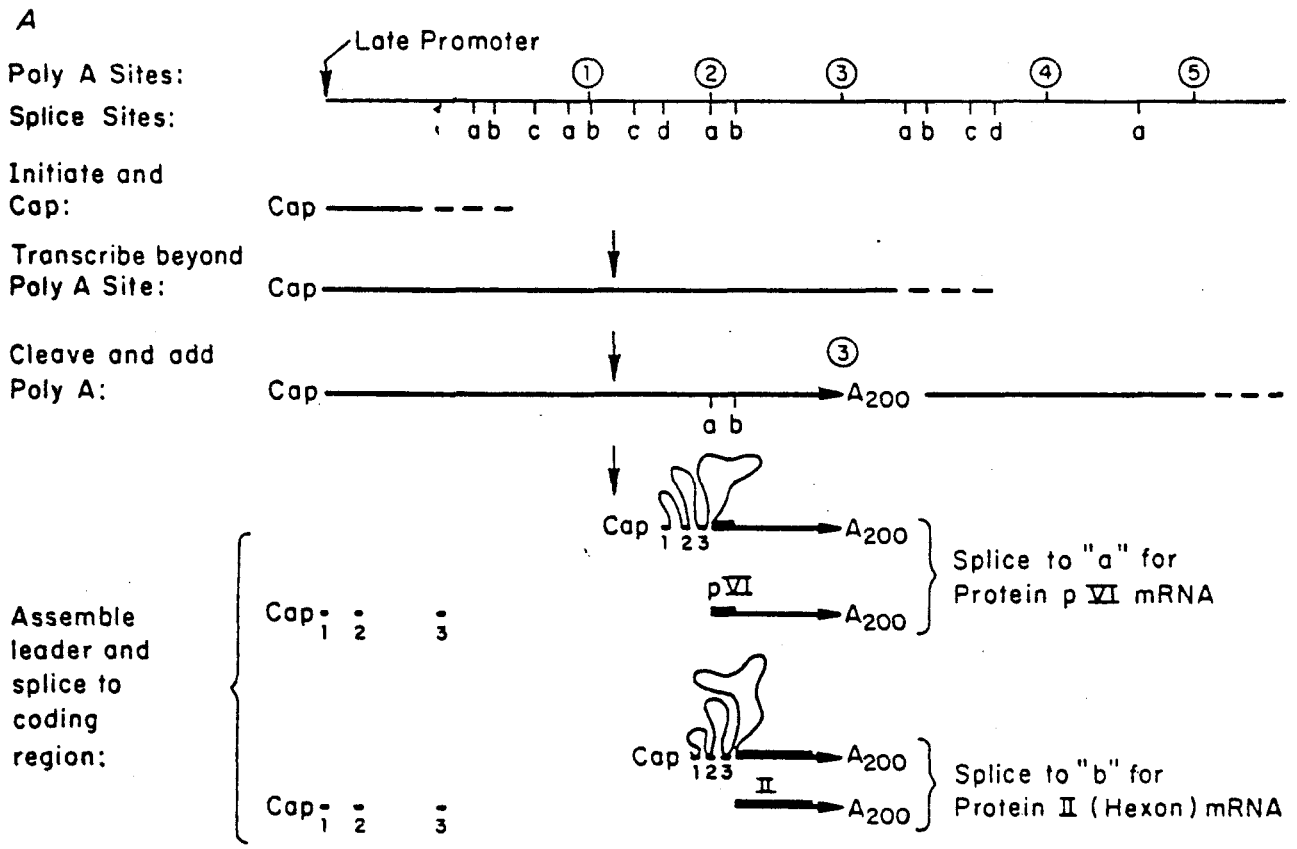


Figure 5 : Modèle d'initiation de la réplication d'après Rekosh et al. (1977).  
Le modèle est basé sur le fait que la protéine terminale agit  
comme amorce.



**Figure 6 :** Modèle de réplication de l'ADN de l'adénovirus d'après LECHNER et KELLY (1977). La réplication commence à l'une ou l'autre extrémité de l'ADN parental et progresse par le déplacement d'une chaîne.



**Figure 7 :** Synthèse des ARNm tardifs de l'adénovirus 2 d'après ZIFF (1980).

- A. Transcription et maturation des ARNm tardifs à partir du promoteur majeur tardif. Les ARN messagers sont "coiffés".
- B. Carte des ARNm de l'adénovirus 2  
 Les ARNm du IVa<sub>2</sub> et du polypeptide IX ne dépendent pas du promoteur majeur tardif. Les espèces dépendant de l'unité de transcription majeure tardive appartiennent à 5 familles. A l'intérieur de chaque famille le site de polyadénylation est commun.

b) Rôle précoce du promoteur majeur tardif (MLP)

Des ARNm de la famille L1 ont été mis en évidence dès le début du cycle viral (une heure après infection) (SHAW and ZIFF, 1980). Ces messagers permettent la traduction des polypeptides 52-55 K. LEWIS et al. (1985) montrent que deux polypeptides de 13,5 K et 13,6 K de la région Lo sont également exprimés au stade précoce.

Par contre l'ARNm du polypeptide IIIa de la région L1, qui possède le même site de polyadénylation que les polypeptides 52-55 K, n'est transcrit que tardivement.

Selon SHAW et ZIFF (1980), le rôle précoce du promoteur majeur tardif pourrait être un des facteurs de contrôle de la production des ARNm des familles L2, L3, L4, L5.

c) Les ARNm ne dépendant pas du MLP

a) L'ARNm du polypeptide IX

L'ARNm du polypeptide IX est dans l'unité de transcription de la zone E1B. Sa synthèse est intermédiaire entre celle des messagers précoces et tardifs. Elle est insensible aux substances qui inhibent la transcription des messagers tardifs (cycloheximide) (PERSSON et al., 1978).

L'ARNm du polypeptide IX n'est pas épissé, son extrémité 3' est commune à celle des ARNm de la zone E1B.

$\beta$ ) ARNm du polypeptide IVa<sub>2</sub>

Le IVa<sub>2</sub> est la seule protéine tardive codée par le brin I (entre 15 et 10 UG). Elle possède un promoteur propre qui s'étend de 16,1 à 15,7 UG, mais pas de séquence TATAA (TATA Box) (BAKER and ZIFF, 1981). Ce promoteur est en compétition avec le promoteur majeur tardif (MLP) pour un site de fixation de l'ARN polymérase II (NATARAJAN et al., 1984 ; NATARAJAN et al., 1985).

d) Les ARN viraux associés (VA-RNAs)

Ils sont transcrits par l'ARN polymérase III (WEINMAN et al., 1974) en grande quantité, lors de la phase tardive.

Tableau 2 : les protéines tardives

Protéines structurales	Région codante	Nbre de monomères et élongation	MM réelle	MM apparente PAGE SDS	Biosynthèse d'un précurseur	Nbre de copies par virion	Localisation dans la capsid
Hexon	L3	3 II	108	120	-	252	Faces + régions péripentonales
Base du penton	L2	3 III (b) ou 5 III (a)	63,3	85	-	12	Apex
IIIa	L1	1 III a	63,2	66	pIIIa 67	60 ou 74 (a)	Apex
Fibre	L5	2 IV b ou 3 IV (a)	61,9	62	-	12	Apex
V	L2	1	-	48,5	-	180	Protéine du nucléoïde
VI	L3	dimère ou trimère	-	24	pVI 27	450 monomères	Association aux hexons
VII	L2	tétramère ou hexamère	-	18,5	pVII20	1070 monomère	Protéine du nucléoïde
VIII	L4	monomère	-	13	pVIII 26 pVIII 27	210 (a)	Association aux hexons
IX	E1B	trimère (a)	-	12	-	247 (a) monomères	Association aux groupes de 9 hexons des faces

(a) VAN OOSTRUM et BURNETT, 1985

(b) DEVAUX et al., 1985



Leur séquence se situe à 30 UG sur le brin r du génome viral (MATHEWS, 1975), et code pour deux VA-RNAs (VA-RNA1 et VA-RNA2) d'une longueur approximative de 160 nucléotides. Chaque VA-RNA est constitué de deux espèces différant par leur extrémités 5'.

Un mutant de délétion sur le gène de VA-RNA2 s'exprime de façon comparable au virus sauvage, alors que le mutant H2 dl 330 délété sur le gène de VA-RNA1 à un taux de production 20 fois inférieur (THIMMAPAYA et al., 1982).

L'espèce VA-RNA1 est nécessaire à la traduction des ARNm viraux tardifs, elle interviendrait au niveau de l'initiation de la traduction (SCHNEIDER et al., 1984).

## 2- Polypeptides tardifs : structures et propriétés

### a) Introduction (Cf. Tableau 2)

La majorité des synthèses protéiques au stade tardif concerne les protéines de structure de la capside. Néanmoins des protéines non structurales, impliquées dans le mécanisme d'assemblage des capsides, sont également traduites à ce stade (D'HALLUIN et al., 1978a ; OOSTEROM DRAGON and GINSBERG, 1981 ; PERSSON et al., 1979b). Enfin, certaines zones précoces comme la E2A, s'expriment encore au stade tardif (Van der VLIET and LEVINE, 1973).

Tous les polypeptides viraux tardifs ont un taux de synthèse maximal vers la 20e heure après infection (HORWITZ et al., 1969 ; WALTER and MAIZEL, 1974). L'expression des protéines de la cellule hôte est alors complètement réprimée. Lors de l'infection virale, les antigènes viraux solubles sont produits en large excès (HILLEMAN et al., 1955). Seulement 20 à 30 % des hexons et 1 à 5 % des bases du penton et des fibres traduits seront assemblés dans les particules (WHITE et al., 1969 ; EVERITT et al., 1971).

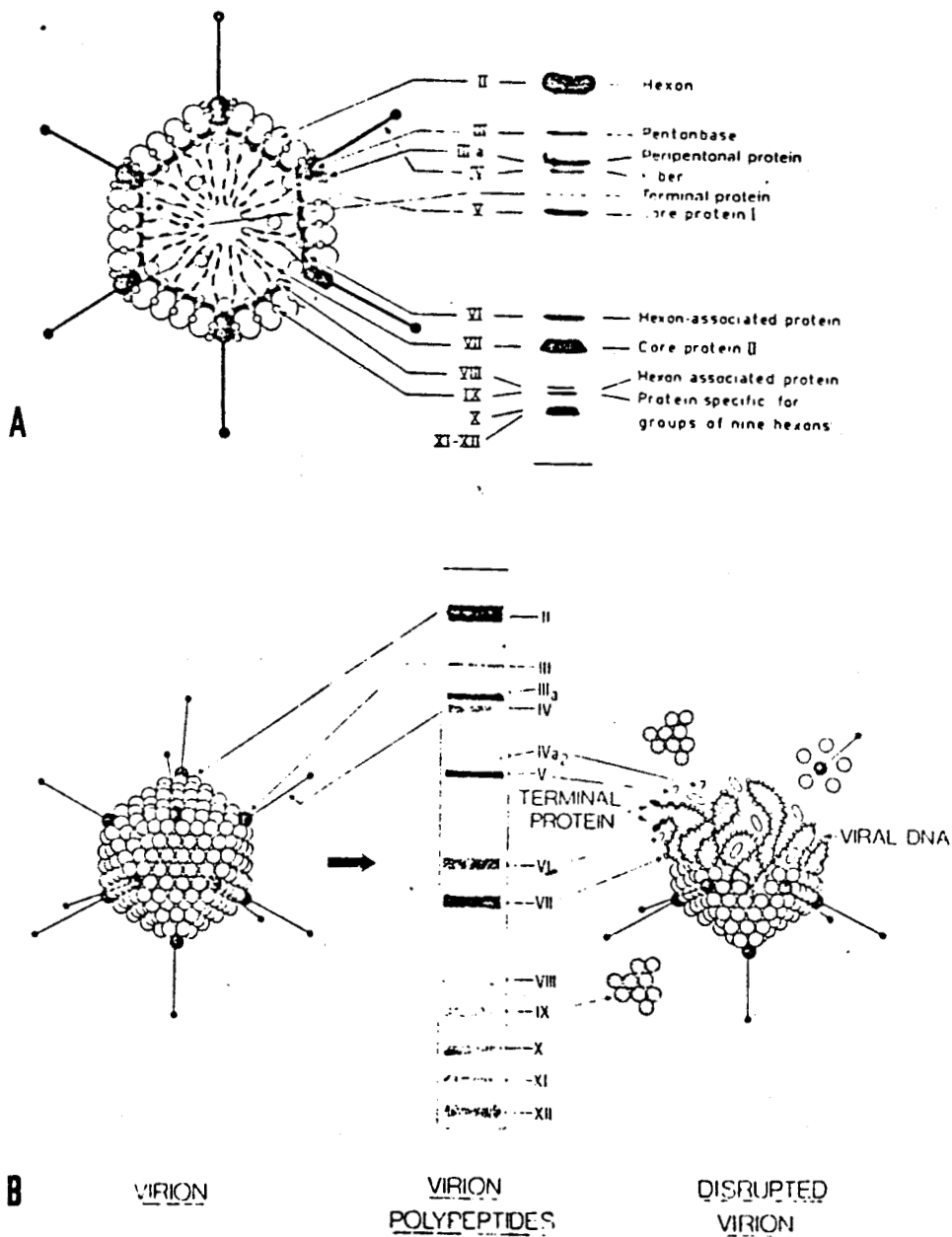
La première caractérisation des polypeptides de l'adénovirus fut réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide (MAIZEL et al., 1968a). Ils déterminèrent une dizaine de polypeptides numérotés de II à XII (Cf. Fig. 8).

Dans un premier temps, nous étudierons les caractéristiques de ces polypeptides avant d'examiner leur rôle dans l'assemblage des particules.

### b) L'hexon

Cette protéine majeure de la capside a été purifiée par chromatographie (LEVINE and GINSBERG, 1967), électrophorèse préparative en





**Figure 8 :** Localisation des protéines tardives dans la capside virale (PHILIPSON, 1983).

A- Modèle basé sur l'étude de pontages protéine-protéine (EVERITT et al., 1975).

B- Modèle schématique (PRECIOUS et RUSSELL, 1982).

veine liquide (BOULANGER et al., 1969), cristallisation (PEREIRA et al., 1968).

Le gène de l'hexon est situé entre 50,3 et 60,2 UG dans la région L3.

Le capsomère hexon, unité répétitive de la capsid, est un trimère de polypeptide II identiques (BOULANGER and PUVION, 1973 ; JORNVALL et al., 1974a) possédant une masse moléculaire apparente de 120 K, une vitesse de sédimentation de 12,9 S, et un point isoélectrique compris entre 5,4 et 6,1. Son extrémité N-terminale est une Alanine N-acétylée (JORNVALL et al., 1974b).

La purification quantitative d'hexon de l'adénovirus de type 2 a permis de déterminer la séquence des 966 AA qui lui confère une masse réelle de 108 K (JORNVALL et al., 1981).

Deux classes d'hexons de mobilités différentes (PAGE SDS) ont été mises en évidence (PETTERSSON, 1971 ; BOULANGER et al., 1978a). Les hexons lents ont une cinquantaine d'AA clivés à leur extrémité N-terminale, ils ne peuvent être assemblés en virions mais sont beaucoup plus antigéniques.

L'hexon possède des déterminants antigéniques de groupe ( $\alpha$ ) et de type (E) spécifiques (NORRBY et al., 1969). L'hexon est couramment représenté comme un tronc de cône creux (PETTERSSON et al., 1967). L'étude en cristallographie de rayons X a permis "d'affiner" cette image (BERGER et al., 1978 ; BURNETT et al., 1985a ; BURNETT et al., 1985b). Le capsomère pourrait être schématiquement représenté avec un sommet triangulaire interne reposant sur une base externe hexagonale par l'intermédiaire de trois piliers. Cette structure possède une symétrie en accord avec la nature trimérique de l'hexon. Par ailleurs, la forme hexagonale très dense de la base externe du capsomère est conforme à sa fonction biologique.

### c) Le penton

Les pentons occupent les douze sommets de l'icosaèdre viral. Le capsomère penton résulte de l'association non covalente entre deux protéines structurales la base du penton et la fibre.

La dissociation du penton complet en ses constituants se produit sous l'effet d'agents tels que la formamide (NEURATH et al., 1968), la pyridine (PETTERSSON and HOGLUND, 1969), le déoxycholate de sodium (DOC) (BOUDIN et al., 1979).

La vitesse de sédimentation du penton complet est de 11 S (PETTERSSON and HOGLUND, 1969). Sa masse totale a longtemps été estimée entre 360 et 660 K. L'utilisation des techniques de diffusion de neutrons permet de déterminer une masse totale de 365 K (DEVAUX et al., 1982).

Une autre approche, par la détermination du taux de marquage des protéines virales à l'aide d'un AA particulier par rapport à sa représentation dans la séquence, donne une valeur de 502 K pour le penton complet (van OOSTRUM and BURNETT, 1985).

#### α) La base du penton

Elle est codée par la famille de gènes L2. Le polypeptide III monomère de la base a une masse apparente de 85 K (ANDERSON et al., 1973 ; EVERITT et al., 1973). La base du penton a une vitesse de sédimentation de 9,5 S. Elle a longtemps été considérée comme un pentamère. En 1982, DEVAUX et al. déterminèrent une masse totale de 246 K laissant prévoir une nature trimérique. Néanmoins, une nouvelle approche biochimique remet en valeur l'hypothèse d'une base pentamérique (van OOSTRUM and BURNETT, 1985).

L'extrémité N-terminale du polypeptide III est bloquée par N-acétylation (BOUDIN et al., 1979). La base est impliquée dans les effets cytotoxiques que l'on observe dans les cellules infectées à haute multiplicité 8 heures après l'infection (VALENTINE and PEREIRA, 1965). Le phénomène de cytotoxicité aboutit à la granulation du cytoplasme, à l'arrondissement des cellules et finalement à leur détachement du support (PEREIRA, 1958 ; ROWE et al., 1958). L'addition de sérum anti-penton au milieu de culture supprime l'effet cytotoxique (PETTERSSON and HOGLUND, 1969).

Une activité endonucléase est étroitement associée aux pentons (BURLINGHAM et al., 1971). La dissociation de cette activité de la base n'est possible qu'à haute concentration en sels (MARUSYK et al., 1975).

La base possède des déterminants antigéniques de groupe et de type (NORRBY, 1969).

#### β) La fibre

Il s'agit de la seule protéine codée par la famille de gènes L5 à l'extrémité droite du génome.

Le polypeptide IV, monomère de la fibre, a une masse moléculaire apparente de 62 K (MAIZEL et al., 1968b ; DORSETT and GINSBERG, 1975). Il est glycosylé par deux résidus N-acétylglycosylamine associés à sa chaîne polypeptidique. Son coefficient de sédimentation est 6 S. Sa longueur est l'un des caractères intervenant dans la classification des différents sérotypes d'adénovirus.

Des études structurales récentes suggèrent que la fibre ne serait pas un trimère comme il était acquis, mais un dimère dont la masse serait comprise entre 156 et 207 K (DEVAUX et al., 1982 ; DEVAUX et al., 1984 ; GREEN et al., 1983). De même que pour la base, cette interprétation est à nouveau controversée par d'autres travaux favorables à une structure trimérique (van OOSTRUM and BURNETT, 1985). Pour un modèle de fibre trimérique, DORSETT et GINSBERG (1975) proposent une structure composée de deux chaînes identiques et une 3e différente. Un seul gène codant pour la fibre étant identifié, la variation de la 3e chaîne aurait été le résultat de modification post-traductionnelle.

L'hypothèse d'une fibre dimérique s'associant à une base du penton trimérique (DEVAUX et al., 1982), elle-même située aux sommets (de symétrie 5) de l'icosaèdre pose de nombreux problèmes de conformation.

La fibre possède un rôle dans l'attachement de la particule virale au récepteur cellulaire. La fixation du virus sur la membrane cellulaire est inhibée par l'addition d'anticorps antifibre (PHILIPSON et al., 1968).

#### d) Le polypeptide IIIa

La région L1 code pour ce polypeptide de masse moléculaire apparente 66 K, et dont la vitesse de sédimentation est 6 S. Lors de son association à la particule virale, le IIIa reste monomérique. Il est phosphorylé par l'activité protéine-kinase associée au virus (BLAIR and RUSSEL, 1978). Le IIIa est traduit sous la forme d'un précurseur N-acétylé, le pIIIa, de masse moléculaire 67 K (LEMAY et al., 1980 ; BOUDIN et al., 1980). Le clivage protéolytique de ce dernier permet la formation du IIIa. Cette protéine de stabilisation est étroitement associée aux apex de la capsidie où elle renforce les liaisons entre pentons et hexons péripentonaux (DEVAUX et al., 1982 ; van OOSTRUM and BURNETT, 1985). Un rôle de partage entre les hexons péripentonaux et les polypeptides VII du nucléoïde lui a également été conféré (EVERITT et al., 1975).

#### e) Le polypeptide VI

Le gène codant pour le polypeptide VI est adjacent à celui de l'hexon dans la région L3 ; les deux protéines sont lues dans le même cadre de lecture.

Le VI est un monomère de masse moléculaire apparente 24 K (MAIZEL et al., 1968), synthétisé sous la forme d'un précurseur de 27 K, le pVI

(EDVARDSON et al., 1976). Des dimères et des trimères de 50 K et 72 K ont été observés (LEMAY and BOULANGER, 1980). Les dimères ont une interaction très forte avec le polypeptide V (CHATTERJEE et al., 1985). 249 acides aminés forment la chaîne polypeptidique du pVI (AKUSJARVI and PERSSON, 1981). Le clivage protéolytique, lors de la maturation du virus, ôte 33 AA de la partie N-terminale de la chaîne. L'extrémité C-terminale du VI possède une vingtaine d'acides aminés hydrophobes consécutifs suivis d'une séquence de quatre AA basiques, cette configuration, voisine de celle des protéines transmembranaires, pourrait signifier un rôle inconnu du pVI (AKUSJARVI and PERSSON, 1981).

Jusqu'à présent, le VI est classé comme protéine stabilisatrice de la capsid, de par son association étroite avec les hexons (EVERITT et al., 1975).

#### f) Le polypeptide VIII

Sa zone codante appartient à la région L4. Un polypeptide précurseur pVIII de masse moléculaire apparente 27 K est traduit (OBERG et al., 1975).

Le pVIII est composé de 227 AA et a une masse moléculaire réelle de 24,7 K (HERISSE et al., 1980).

Le polypeptide mature VIII de masse apparente 13 K (MAIZEL et al., 1968) résulte du clivage protéolytique du pVIII. Le VIII est associé aux hexons des zones apicales et possède un rôle de stabilisation de la capsid.

#### g) Le polypeptide IX

Le polypeptide IX a une masse moléculaire réelle de 14,3 K ; 139 AA forment sa chaîne polypeptidique (ALESTROM et al., 1980). On ne lui connaît pas de précurseur. Il s'agit d'un des seuls polypeptides tardifs qui ne dépende pas du promoteur majeur tardif.

Son association aux groupes de 9 hexons lui confère un rôle structural important. De plus, le fait que son ARNm soit exprimé au stade précoce (PERSSON et al., 1979b) suggère qu'il n'a pas uniquement un rôle structural.

#### h) Les protéines du nucléoïde

Trois protéines, le V, le VII et le  $\mu$  confèrent à l'ADN viral une structure "chromatine like" (MAIZEL et al., 1968b ; VAYDA et al., 1983).

Les gènes codant pour le V et le VII appartiennent à la famille L2. La localisation de la région codante de  $\mu$  n'est pas connue.

### a) Le polypeptide VII

La traduction de son ARNm produit le polypeptide précurseur pVII de masse moléculaire 20 K (EVERITT et al., 1973 ; ANDERSON et al., 1973). Le polypeptide VII de masse apparente 18,5 K provient du clivage protéolytique du pVII. La protéine VII est un monomère, sa composition en acides aminés révèle une proportion importante de résidus basiques. En effet 23 % des AA sont des arginines. Cette structure la rapproche des histones cellulaires.

A peu près 1100 copies du polypeptide VII sont présentes dans chaque particule. Ceci confère un rapport de masse, entre l'ADN viral et le VII, proche de 1 (CORDEN et al., 1976 ; SUNG et al., 1977). La moitié des groupements phosphates acides de l'ADN viral peuvent être neutralisés par les résidus basiques des arginines des polypeptides VII (PRAGE and PETTERSSON, 1971 ; SUNG et al., 1983).

L'association de l'ADN viral et des polypeptides VII est une structure stable et compacte, résistante aux sels et aux détergents tels que le DOC (Deoxycholate de sodium) à 5 %.

En 1983, VAYDA et al. suggéraient que le VII, seul, serait nécessaire au maintien de la structure "nucléosome like".

### β) Le polypeptide V

Le polypeptide V est un monomère de masse apparente 48,5 K (MAIZEL et al., 1968b), dont il existe 180 copies par virion. Son association à l'ADN viral est beaucoup plus labile que celle du polypeptide VII (VAYDA et al., 1983). Parallèlement, sa composition en AA basiques est beaucoup plus faible.

Le V établirait une liaison entre la base du penton et l'ADN viral (EVERITT et al., 1973).

### γ) Le polypeptide μ

Il a une masse très faible, de 4 à 5 K. Sa séquence d'AA est très caractéristique, avec 69 % d'AA basiques dont 54 % sont des arginines (HOSAKAWA and SUNG, 1976). 125 copies de ce polypeptide sont associées à l'ADN au sein du nucléoïde. Elles peuvent être dissociées de ce dernier, avec le polypeptide V, par traitement au NaCl 0,5 M (VAYDA et al., 1983).

## δ) Structure générale du nucléoïde

La structure du nucléoïde viral est fréquemment comparée à celle des nucléosomes cellulaires.

Dans la particule virale infectieuse de l'adénovirus, il n'existe pas d'histones cellulaires, contrairement aux papovavirus.

Les histones cellulaires ont un rôle de protection de l'ADN vis-à-vis des nucléases. Ce même rôle n'est pas clairement établi pour les protéines du nucléoïde. En effet, en 1976, CORDEN et al. observèrent l'apparition de bandes d'ADN de 200 à 1800 paires de bases, lors d'une digestion ménagée des nucléoïdes viraux par la nucléase micrococcale.

Néanmoins ces résultats ne purent être reproduits, les profils relativement hétérogènes avec des fragments de tailles toujours inférieures ayant été obtenus par la suite (VAYDA et al., 1983). Dans les mêmes conditions, MIRZA and WEBER (1982) obtinrent des fragments d'environ 150 paires de bases, chacun de ces fragments associé à 6 polypeptides VII serait espacé d'une séquence de taille variable liée à une molécule de V.

En fait des fragments discrets d'ADN viral ont été mis en évidence par DANIELL et al., (1981), à partir d'extraits de noyaux de cellules infectées, 3 heures post infection. La sensibilité de l'ADN viral à la nucléase micrococcale n'est pas la même pour un ADN extrait d'un virion que pour cet ADN extrait des noyaux de cellules infectées. L'ADN viral a une structure nucléosomique vraie (associée à des histones cellulaires) dans le noyau avant l'assemblage du virus (SERGEANT et al., 1979 ; TATE and PHILIPSON, 1979 ; DANIELL et al., 1981).

La structure du nucléoïde viral est composée de l'association du polypeptide VII et de l'ADN en un complexe, entouré d'une enveloppe de polypeptide V. Le polypeptide  $\mu$  assurant la liaison entre ces deux sous structures (CHATTERJEE et al., 1985).

### i) Les polypeptides X-XII

Ce sont de petits polypeptides mis en évidence par MAIZEL (1968a). Leur masse moléculaire apparente est comprise entre 5 et 7 K. Ni la localisation de leur séquence codante, ni leur rôle ne sont connus. Probablement, ils résultent du clivage des précurseurs tardifs. Le polypeptide  $\mu$  pourrait être un de ces polypeptides (HOSAKAWA and SUNG, 1976).

### 3- Polypeptides tardifs non structuraux

#### a) Le polypeptide IVa<sub>2</sub> - 50 K

Maizel décrit, en 1971, un polypeptide mineur de l'adénovirus de masse moléculaire apparente 50-55 K : le IVa<sub>2</sub>. Le gène du IVa<sub>2</sub> est localisé entre 18,1 et 11,3 UG (fragment de restriction Sma IF) (PERSSON et al., 1979b) et est transcrit par le brin gauche du génome (PETTERSSON et al., 1976).

En 1978, LEWIS et al., traduisirent "in vitro" le polypeptide IVa<sub>2</sub>, à partir d'ARNm tardifs sélectionnés par hybridation au fragment de restriction Hind III C (7,5 - 17 UG).

Le IVa<sub>2</sub> est présent dans les particules virales non infectieuses, mais disparaît lors de la maturation du virus. Des expériences de marquage montrent qu'il n'est pas recyclé (PERSSON et al., 1979b).

Le IVa<sub>2</sub> possède un rôle dans l'échafaudage de la particule (D'HALLUIN et al., 1978a).

#### b) La 100 K et la 33 K (Cf. Fig. 9)

Ces deux protéines font partie de l'unité de transcription L4.

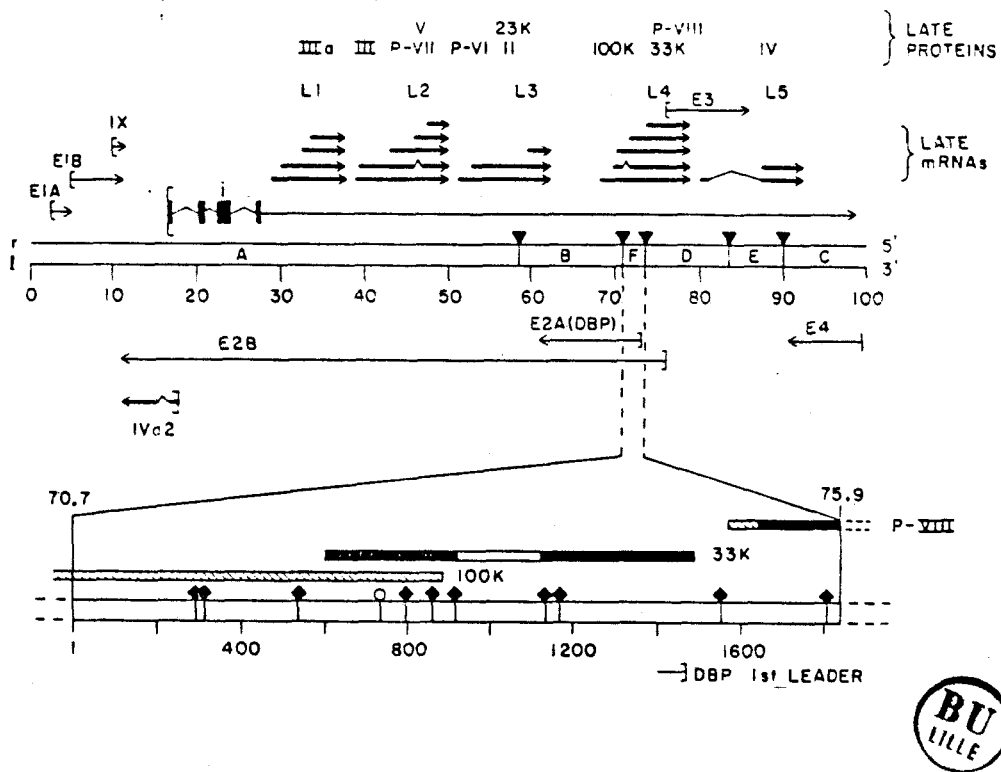
##### a) La protéine 100 K

La 100 K est une phosphoprotéine tardive non structurale synthétisée en grande quantité (RUSSELL and SKEHEL, 1972). Elle est purifiée par chromatographie d'échange d'ions et d'affinité (OOSTERON-DRAGON and GINSBERG, 1980).

Comme le IVa<sub>2</sub>, elle n'est pas associée aux particules infectieuses.

La 100 K est une protéine plurifonctionnelle qui intervient dans la trimérisation de l'hexon (GAMBKE and DEPERT, 1981a,b ; GAMBKE and DEPERT, 1983 ; CEPKO and SHARP, 1982 ; OOSTEROM-DRAGON and GINSBERG, 1980), ainsi que dans le transfert de celui-ci du cytoplasme vers le noyau (GAMBKE and DEPERT, 1983). Ces fonctions seront détaillées dans le chapitre traitant de l'assemblage.





**Figure 9 :** Carte du génome de l'adénovirus. La partie inférieure de la figure détaille le fragment EcoRI-F (70,7 à 75,9 UG). Les régions codantes pour les protéines 100 K, 33 K, et pVIII y sont indiquées (OOSTERON-DRAGON and ANDERSON, 1983).



β) 33 - 39 K

La protéine 33 K possède 227 AA ; sa masse réelle, calculée à partir de la séquence nucléotidique est de 24,8 K ; le contenu élevé de Glu et Asp peut expliquer la variation importante entre sa masse réelle et sa masse apparente.

Une étude approfondie des peptides tryptiques de la 33 K et un séquençage partiel de certains de ces peptides ont permis de montrer que la 33 K est lue dans 2 cadres de lecture différents (OOSTEROM-DRAGON and ANDERSON, 1983). La partie N-terminale de la 33 K chevauche la partie C-terminale de la 100 K sur 281 nucléotides. Cependant, la 100 K est codée dans le premier cadre de lecture (MILLER et al., 1980), alors que dans cette zone la 33 K est lue dans le deuxième cadre ouvert (contrairement aux résultats préliminaires d'AXELROD, en 1978, la 33 K et la 100 K n'ont aucun peptide commun).

Immédiatement après cette zone codante chevauchante, l'ARNm de la 33 K est épissé. Les deux cents nucléotides ôtés décalent la zone codante de la partie C-terminale de la 33 K dans le 3e cadre de lecture ouvert comme le montre l'analyse des peptides tryptiques et le séquençage en AA partiel réalisés par OOSTEROM-DRAGON et ANDERSON en 1983.

La 33 K est la seule protéine tardive connue de l'adénovirus dont l'ARNm soit épissé dans sa région codante. Jusqu'alors seuls des produits de E1A possédant cette caractéristique avaient été identifiés (SMART et al., 1981).

La 33 K est absente des virions matures. Elle pourrait intervenir dans l'échafaudage des particules.

Aucun mutant de cette protéine n'a été isolé et ceux de la 100 K ne semblent pas affecter cette protéine.

c) La protéase virale : 23 K

La protéase virale fut mise en évidence grâce à l'étude d'un mutant thermosensible H2 ts 1 (WEBER, 1976) qui accumule des particules non infectieuses. Ces particules contiennent les précurseurs non clivés des polypeptides IIIa, VI, VII et VIII. Le gène muté de H2 ts 1 fut localisé dans la région L3 par des expériences de recombinaison intersérotypique (HASSEL and WEBER, 1978).

La séquence nucléotidique de cette région révèle un cadre de lecture ouvert entre 60 et 61,7 UG, pouvant coder pour un polypeptide de 23 K (AKUSJARVI et al., 1981 ; KRUIJER et al., 1980).

L'ARNm et son produit de traduction sont formés en très petites quantités (AKUSJARVI et al., 1981), ceci explique que la protéase n'a pas encore été visualisée en électrophorèse. Néanmoins de nombreuses expériences montrent son activité enzymatique liée aux noyaux des cellules infectées et aux particules infectieuses. Dans les particules intermédiaires, aucune activité n'est décelable.

La protéase reconnaît le signal Gly-Ala. Elle possède un rôle fondamental dans la maturation de la particule.

#### d) Les autres protéines non structurales

Trois autres protéines non structurales sont connues : deux d'entre elles de 13,6 K et 13,5 K appartiennent à la région Lo et jouxtent le MLP. La troisième est une 52-55 K codée par la région L1. Leurs ARNm ont la caractéristique commune d'être transcrits à des temps aussi bien précoces et intermédiaires que tardifs (NEVINS and WILSON, 1981).

Aucune de ces protéines n'est associée aux particules virales.

Récemment, LEWIS et al. (1985) ont montré que la 13,6 K était localisée à la périphérie du noyau.

### E- Mécanismes communs aux assemblages viraux

#### 1- Les capsides virales : leur structure

CRICK et WATSON émirent en 1957 l'hypothèse selon laquelle les capsides virales étaient formées de sous-unités protéiques répétées. Ceci permettait une utilisation maximale de l'information génomique.

CASPAR et KLUG (1962) proposèrent en accord avec cette hypothèse un modèle géométrique icosaédrique (possédant 20 faces et 12 sommets), formé de sous-unités répétitives : les capsomères, comme base de la structure de nombreux virus.

L'icosaèdre, le plus simple, est formé de 60 sous-unités. La généralisation du système permet d'obtenir des icosaèdres du type 20 T, où T est appelé nombre de triangulation. Selon cette théorie, l'autoassemblage des sous-unités synthétisées aboutit obligatoirement à une capsidie de symétrie icosaédrique de taille définie.

## 2- Mode d'assemblage viral : bactériophage

La connaissance approfondie de la morphogénèse du bactériophage P22, sa simplicité et surtout ses nombreux traits communs avec l'adénovirus, en font un modèle de base, permettant d'appréhender le mécanisme complexe d'assemblage des adénovirus.

### a) Généralités

Le bactériophage tempéré P22 infecte Salmonella typhimurium. Il possède une tête isométrique d'un diamètre de 600 Å, et une petite queue ; son ADN, double brin circulaire, a une masse approximative de  $27.10^6$  (RHOADES et al., 1968), et porte une séquence répétée à chaque extrémité.

Le génome de P22 se décompose en douze gènes (Cf. Fig. 10) (BOTSTEIN et al., 1973 ; POTEETE and KING, 1977), dont onze sont contigus. Le douzième gène code pour la protéine de la queue.

La nomenclature des douze protéines phagiques structurales et non structurales va de gp1 à gp26 (gpx signifie produit du gène x). Toutes ces protéines ont été identifiées par électrophorèse en gel d'acrylamide SDS (BOLTSTEIN et al., 1973 ; POTEETE and KING, 1977).

Neuf d'entre elles appartiennent à la capsid des bactériophages matures ; les trois dernières participent uniquement à l'élaboration de cette structure. Les deux protéines majeures de P22 sont gp5 et gp8.

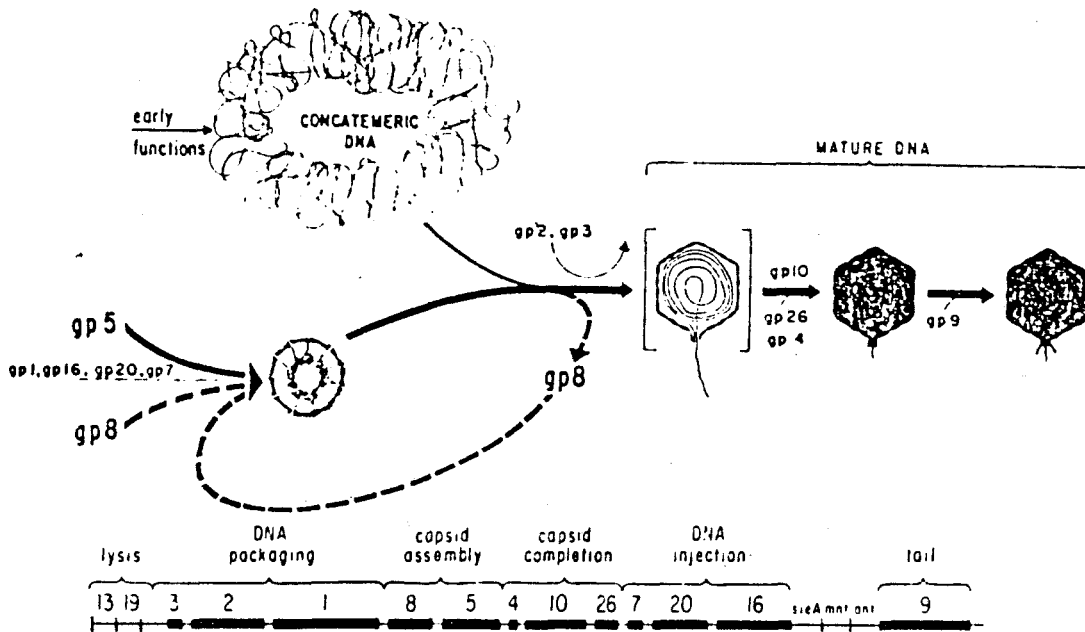
Gp5 est un polypeptide de 55 K qui constitue l'unité de base (capsomère) de la capsid phagique.

Gp8, polypeptide de masse moléculaire 42 K, est absente de la particule infectieuse.

Gp1, gp2, gp3 participent à l'emballage de l'ADN.

Les polypeptides gp7, gp16 et gp20, permettent l'injection de l'ADN dans la bactérie.

Enfin, gp4, gp1, gp10 et gp26 stabilisent la capsid phagique avant l'intégration des protéines gp9 de la queue.



**Figure 10 :** Mécanisme d'assemblage des particules du phage P22 et carte du génome viral d'après KING (1980).  
 La figure montre l'ordre d'interaction des protéines phagiques. Le mécanisme peut être divisé en trois étapes : assemblage d'une précapside, empaquetage de l'ADN dans cette précapside, stabilisation de la nouvelle capside formée (la structure entre crochets est instable).  
 Le génome de P22 est représenté dans la partie inférieure.

## b) Les règles de l'assemblage

Selon J. KING (1980), les règles de l'assemblage sont les suivantes :

- la régulation de la polymérisation des sous-unités protéiques n'est possible que si les protéines sont biosynthétisées dans un état ne permettant pas une polymérisation spontanée. En effet, de nombreuses protéines de bactériophages sont traduites sous une forme inactive, ne permettant pas d'interaction spontanée.

- L'activation des sous-unités formées est réalisée par une liaison au site actif d'une multiprotéine intermédiaire et éphémère. Cette liaison permet un changement conformationnel de la sous-unité fixée, qui autorise l'attachement d'une nouvelle sous-unité. On parle d'assemblage autorégulé.

- La protéine intermédiaire régule à la fois le taux de polymérisation et le positionnement des protéines de structure. Ces protéines qui existent chez les bactériophages ont été appelées protéines d'échafaudage. Chez le phage P22, gp8 est la protéine d'échafaudage.

## c) Formation de la précapside virale (Cf. Fig. 11)

Lors de son assemblage, P22 forme une prêtête qui sédimente à 240 S. Elle est constituée de 420 molécules de gp5 et 200 de gp8, ainsi que de quatre autres espèces mineures gp1, gp7, gp16 et gp20 (KING and CASJENS, 1974).

La prêtête se présente sous l'aspect de deux couches protéiques concentriques. Le rapport de 2 existant entre le nombre de sous-unités gp5 et gp8, lui confère une structure particulière.

L'addition de SDS aux précapsides relargue les protéines d'échafaudage gp8 (KING and CASJENS, 1974). Néanmoins, l'étude en microscopie électronique a permis de constater que la couche protéique externe est intacte après action du détergent. Les produits gp8, localisés à l'intérieur de la prêtête, doivent migrer à travers les interstices de la couche des protéines gp5, lors de leur départ de la prêtête, au moment de l'insertion de l'ADN (GRIFFIN-SHEA, 1977). Des mutants altérés dans le gène 8 produisent un taux normal de gp5, cependant aucune prêtête fonctionnelle n'est formée. Seules quelques structures aberrantes sont observables (BOTSTEIN et al., 1973 ; EARNSHAW and KING, 1978). L'incubation d'un système, constitué des protéines gp8 et gp5 purifiées sous forme soluble et d'un extrait de bactéries infectées par un mutant déficient dans la formation de la prêtête, permet l'obtention de prêtêtes biologiquement

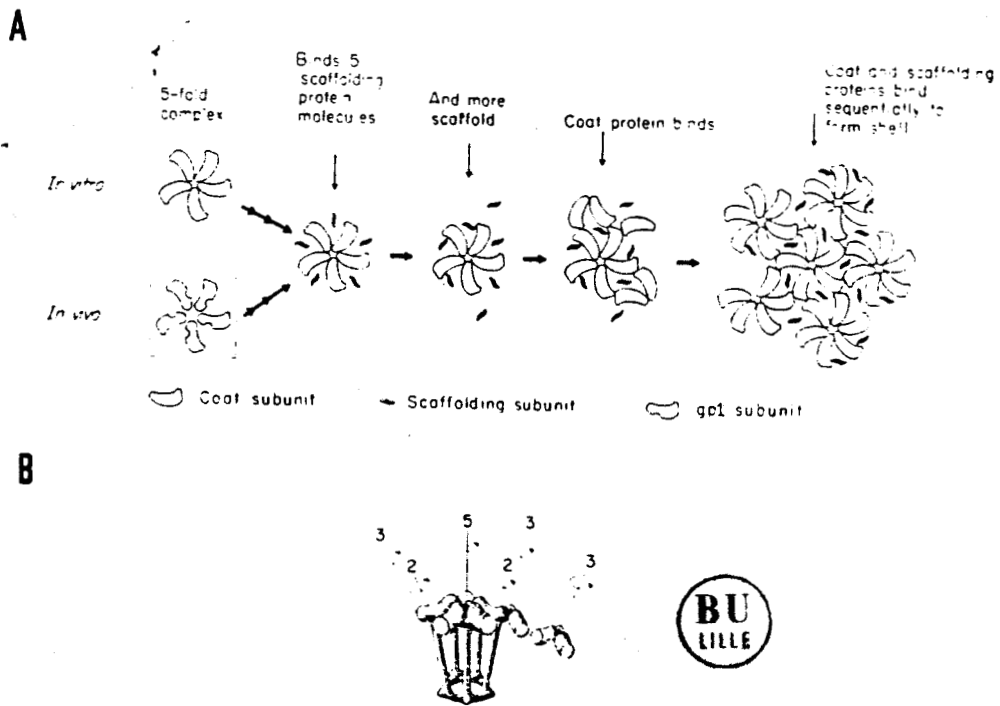


Figure 11 : L'assemblage des précapsides et leur organisation d'après FULLER et KING (1982).

A : bien que le produit du gène 1 ne soit pas nécessaire à la polymérisation "in vitro", il est probable qu'il interagisse avec d'autres protéines mineures "in vivo" pour former les structures apicales.

B : représentation tridimensionnelle des protéines d'échafaudage et de structure.

actives. Gp8 n'est retrouvée, qu'en quantités limitées dans la cellule infectée. KING and CASJENS (1974) ont montré que gp8 est recyclée. En effet, après leur relargage de la précapside, les produits du gène 8 sont capables de réitérer la synthèse d'une nouvelle capsid. Ce mécanisme de recyclage semble pouvoir se réaliser 5 à 7 fois.

Gp8 est impliquée à la fois dans l'initiation de la polymérisation et dans l'évolution de la formation de la capsid.

Bien qu'elles soient associées à la prêtête, les protéines mineures gp1, gp7, gp16 et gp20 n'interviennent pas dans son élaboration. En effet des mutants sur les gènes 7, 16 et 20 élaborent des prêtêtes, mais ne peuvent injecter leur ADN dans la cellule hôte. Une mutation sur le gène 1 interdit l'empaquetage de l'ADN dans la précapsid (BOTSTEIN et al., 1973).

#### d) Empaquetage de l'ADN

L'empaquetage de l'ADN du phage dans la prêtête et le départ des protéines d'échafaudage nécessitent les produits des gènes 1, 2 et 3 (BOTSTEIN et al., 1973).

Gp2 et gp3 reconnaissent un site d'empaquetage sur l'ADN phagique ; la précapsid se lie à ce site par l'intermédiaire de gp5 situé à son apex (EARNSHAW and CASJENS, 1980) ; dès lors la condensation de l'ADN dans la tête commence. L'ADN condensé 250 fois par rapport à sa conformation en solution (EARNSHAW and HARRISSON, 1977) est séparé de l'ADN concatémérique par les produits des gènes 2 et 3 (CASJENS and HUANG, 1982) lorsqu'il emplit la tête.

L'empaquetage de l'ADN provoque une augmentation du rayon de la capsid de l'ordre de 10 %. L'entrée de l'ADN dans la prêtête est couplée au départ des protéines gp5. La capsid résultante n'acquiert sa stabilité qu'avec l'entrée des protéines gp4, gp10 et gp26 (STRAUSS and KING, 1984). L'absence de l'un de ces produits provoque la perte de l'ADN encapsidé (BOTSTEIN et al., 1973) à la fois "in vivo" et "in vitro".

Des phages viables ont été obtenus lors de l'incubation de procapsides biologiquement activées avec un extrait de cellules infectées par un mutant sur le gène 5 exprimant son ADN et les produits mineurs gp1, gp7, gp20, mais non gp5 (POTEETE et al., 1979).



e) Assemblage de la queue du phage P22

Le gène 9 de P22 code pour un polypeptide de masse moléculaire 72 K (GOLDENBERG et al., 1982). Une structure trimérique de gp9, appelée protrimère, est mise en évidence lors de l'assemblage "in vivo" (GOLDENBERG et al., 1982). Ce protrimère est sensible à la trypsine à température ambiante. Le passage à 30° C du protrimère développe sa résistance au clivage tryptique. Cette nouvelle conformation est appelée trimère. Parallèlement, sa mobilité électrophorétique augmente (GOLDENBERG et al., 1982). Six trimères de gp9 s'associent de façon irréversible, bien que non covalente, sur la tête du phage et y forment une base nécessaire à l'attachement à la bactérie hôte.

La queue du phage possède une activité endoramnosidase qui digère l'antigène 0 de Salmonella typhimurium lors du processus d'adsorption (WRIGHT et al., 1980).

3- Assemblage de l'adénovirus

a) Introduction

Lors de la phase tardive du cycle infectieux, les synthèses protéiques de la cellule hôte sont complètement inhibées. Les polypeptides viraux synthétisés sont rapidement détachés des polyribosomes et transportés dans des intervalles de temps courts allant de 3 à 6 mn, dans le noyau de la cellule hôte où a lieu l'assemblage (VELICER and GINSBERG, 1970).

b) Assemblage des capsomères

a) L'hexon

Cette protéine virale majeure représente 10 % des protéines totales de la cellule à la fin du cycle lytique. L'assemblage d'hexons en trimères est très rapide (HORWITZ et al., 1969) et probablement concomittant au transport du cytoplasme au noyau. Il fut rapidement mis en évidence qu'un produit supplémentaire était nécessaire à la trimérisation de l'hexon. En effet, un système de traduction hétérologue d'ARNm d'hexon "in vitro" produit une espèce reconnue uniquement par des anticorps formés contre la sous-unité polypeptidique de l'hexon (STINSKI et al., 1974 ; OBERG et al., 1975). Par contre, un système de traduction "in vitro" de polysomes de cellules

infectées permet la formation d'hexons trimères (PERSSON et al., 1977). Un autre produit viral semblait impliqué dans l'assemblage des hexons.

Les deux mutants thermosensibles H5 ts 17 et H5 ts 20 n'appartiennent pas au même groupe de complémentation que celui de l'hexon, bien qu'ils ne puissent synthétiser de trimères à température non permissive. Le passage des cultures cellulaires infectées par ces mutants, à température permissive pendant 15 minutes, permet l'assemblage des hexons (LEIBOWITZ and HORWITZ, 1975). Le gène affecté dans ces deux mutants est celui codant pour la protéine tardive non structurale 100 K (FROST and WILLIAMS, 1978).

La préincubation, dans un système de traduction "in vitro", d'extraits cytoplasmiques de cellules infectées avec des anticorps dirigés contre le polypeptide 100 K, inhibe la formation des trimères (OOSTEROM-DRAGON and GINSBERG, 1981).

L'utilisation de marquages brefs de cellules infectées suivi de l'incubation en présence d'anticorps monoclonaux anti 100 K et anti-hexon permettent de dénaturer la liaison rapide du polypeptide II nouvellement synthétisé sur le polyribosome, au polypeptide 100 K (CEPKO and SHARP, 1982). L'accumulation d'hexons trimères est parallèle à la baisse du taux de polypeptide 100 K. Les complexes formés entre la 100 K et la protéine majeure de capsid ont une masse moléculaire de 800.000. La 100 K intervient dans cette réaction sous forme oligomérique (CEPKO and SHARP, 1982).

L'étude de plusieurs mutants thermosensibles dans le gène de la 100 K confirme son rôle important dans l'assemblage de trimères d'hexons (CEPKO and SHARP, 1983).

Au cours du cycle infectieux la localisation de la 100 K, par l'utilisation d'anticorps spécifiques, varie du cytoplasme au début de la phase tardive au noyau où elle s'accumule (GAMBKE and DEPERT, 1983). La liaison entre les polypeptides hexon et 100 K pourrait faire intervenir une sérine active. En effet, le DFP (diisopropyl fluorophosphate) s'attache à ces groupements sérines active ; or le DFP interagit avec les chaînes d'hexon naissantes, mais cette interaction disparaît lors de la trimérisation (DEVAUX and BOULANGER, 1980).

L'assemblage des capsomères majeurs de l'adénovirus est comparable à celui des protéines du manteau gp5 du phage P22. Dans les deux cas, l'autoassemblage des sous-unités est impossible. Le mécanisme de trimérisation chez l'adénovirus, de polymérisation chez P22, nécessite la présence d'une protéine dite d'échafaudage (100 K ou gp8), dont la liaison à la chaîne

capsomérique naissante provoque des changements conformationnels autorisant la liaison de nouvelles sous-unités.

100 K et gp8 sont absentes des particules infectieuses.

### β) Le penton

La fibre est formée en large excès lors du cycle lytique ; la base du penton synthétisée en faible quantité est le facteur limitant de la formation des pentons complets (BOUDIN and BOULANGER, 1982).

L'accumulation des pentons complets dans le noyau est effectuée quelques minutes après la traduction de ses constituants (VELICER and GINSBERG, 1970).

BOUDIN et BOULANGER (1982) réalisèrent l'assemblage "in vitro" des pentons complets dans un système comprenant la fibre purifiée et un extrait de cellules infectées par un mutant thermosensible, fibre défectif, H2 ts 125. L'association observée entre la base accumulée dans les cellules et la fibre purifiée du virus sauvage est un phénomène réversible se produisant dans une gamme de pH comprise entre 5,5 et 9. Cet assemblage n'est pas de type spécifique puisque des chimères de pentons entre les sérotypes 2 et 5 ont pu être obtenues (BOUDIN and BOULANGER, 1982).

### c) Les groupes de 9 hexons

La séparation des composants viraux obtenues après traitement du virus au DOC (déoxycholate de Na) (BOULANGER et al., 1978b) sur gradient de glycérol met en évidence des groupes de 9 hexons constitués des hexons des faces, associés aux polypeptides IX. Une particule virale est composée de 20 groupes de 9 hexons, soit 180 hexons appartenant aux faces, et douze groupes de 5 hexons associés au 12 sommets de l'icosaèdre, soit 60 hexons péripentonaux. Si l'on considère le modèle d'hexons trimériques de BURNETT et al., (1985a,b), la disposition interne des hexons en triangles équivalents permet de créer deux types d'espaces entre les hexons voisins. Donc, quatre grands espaces et trois petits existent dans chaque groupe de 9 hexons. Van OOSTRUM et BURNETT (1985) proposent l'association de trois polypeptides IX dans chaque grand espace des faces (Cf. Fig. 12). Ces trimères de IX permettent d'assurer la solidité des faces, par ailleurs l'addition d'hexons péripentonaux ne crée que de nouveaux petits espaces. Ceci explique l'absence de polypeptides IX dans les structures apicales isolées.

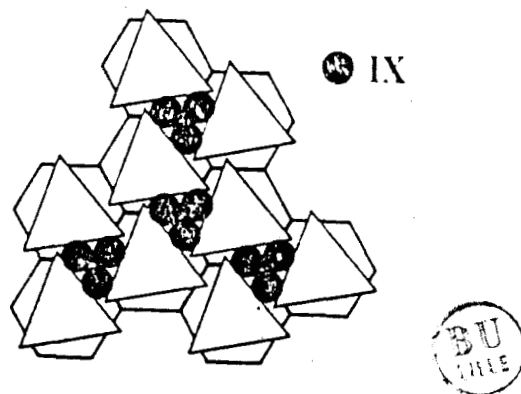


Figure 12 : Modèle de distribution des protéines IX en trimères à l'intérieur des groupes de 9 hexons d'après van OOSTRUM et BURNETT (1985).

Par marquage, Van OOSTRUM et BURNETT (1985) montrent que 12 (et non 15) polypeptides IX sont associés à chaque face. Ce chiffre conforte leur hypothèse de quatre trimères de IX présents par face.

Les groupes de 9 hexons représentent une étape de la morphogénèse de la capside.

#### d) Essais d'assemblage de capsides vides "in vitro"

Des groupes de 9 hexons purifiés s'aggrègent à bas pH et à 4° C et forment des structures multimériques (PEREIRA and WRIGLEY, 1974).

Par cette méthode, des associations par paires, rangs de cinq et des capsides à 20 faces dépourvues d'apex purent être observées en microscopie électronique (PEREIRA and WRIGLEY, 1974).

Néanmoins, la complexité de l'adénovirus n'a jamais permis de réaliser des systèmes simples d'assemblage "in vitro" comme chez les phages.

Quelques étapes de la morphogénèse ont cependant pu être mises en évidence par des expériences de marquage et l'utilisation de mutants thermosensibles.

#### e) Les capsides vides

L'analyse en gradient isopycnique de CsCl de la progéniture virale d'une culture cellulaire, 16 heures après infection, révèle plusieurs bandes virales s'équilibrant à des densités différentes. Les modifications et les réarrangements intervenant dans les capsides reflètent la cinétique d'incorporation des différentes protéines virales. Des expériences de marquages suivis de chasses ont montré que certaines particules vides étaient les précurseurs des virions infectieux.

Les intermédiaires d'assemblage étant souvent très instables il était important de ne pas léser leur structure, afin que leur analyse polypeptidique soit le reflet exact de la situation dans le noyau de la cellule.

L'inconvénient de l'ultracentrifugation est que certaines de ces particules sont soumises à de haute force ionique, des méthodes d'extraction douces furent donc mises au point.

- EDVARSSON et al. (1976) purifient les particules par passage sur gradient de Ficoll avec ou sans fixation préalable et irréversible au glutaraldéhyde des extraits nucléaires des cellules infectées, traités au ultrasons.

- D'HALLUIN et al. (1978b) lysent les noyaux des cellules au sulfate d'ammonium (WALLACE and KATE, 1972), puis réalisent un gradient de saccharose. Les particules prépurifiées obtenues sont alors consolidées par un agent pontant clivable, le DMTB (dithiobisbutyrimidate) et repurifiées sur gradient isopycnique de CsCl.

L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS (PAGE-SDS) des polypeptides des capsides vides, apparaissant les premières lors du cycle infectieux, permet différentes observations (ISHIBASHI and MAIZEL, 1974 ; EDVARDSON et al., 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978a) :

- . les polypeptides formant le squelette de la capside sont présents (II, III, IV, IX) ;
- . les trois protéines impliquées dans la stabilisation de la particule existent sous forme de précurseurs pIIIa, pVI et pVIII ;
- . les polypeptides V et VII associés à l'ADN viral sont absents ;
- . des polypeptides n'existant pas dans le virus infectieux, 100 K, IVa<sub>2</sub>-50 K, 33-39 K, sont associés aux particules ;
- . fréquemment, les capsides vides contiennent un fragment d'ADN bicaténaire (D'HALLUIN et al., 1978a,b). Il pourrait être le résultat d'une incorporation peu spécifique du fait du processus d'extraction. Néanmoins, des expériences d'hybridation montrent que la partie gauche du génome est surreprésentée (CHEE-SEUNG and GINSBERG, 1982).

Des mutants thermosensibles de la région L1 tels que H2 ts 112 (D'HALLUIN et al., 1978a), H5 ts 58 (EDVARDSSON et al., 1978) et sur la région L5 tels que H5 ts 142 (CHEE-SEUNG and GINSBERG, 1982), H2 ts 5 (EDVARDSSON et al., 1978) et H2 ts 125 (D'HALLUIN et al., 1980 ; D'HALLUIN et al., 1982), possèdent la caractéristique commune d'arrêter leur morphogénèse au stade "particules vides" lors de leur croissance à température restrictive. Cependant, certaines différences sont observées dans la présence (EDVARDSSON et al., 1978 ; CHEE SEUNG and GINSBERG, 1982) ou non (D'HALLUIN et al., 1978a) du précurseur du polypeptide VII dans ces intermédiaires. La maturation possible des capsides vides formées, à température restrictive dans les cultures cellulaires infectées par des mutants thermosensibles tels que H2 ts 112, en virions infectieux après passage à température permissive confirme que les particules vides représentent un état intermédiaire de la morphogénèse virale et non un artefact de préparation. Les capsides vides, sans ADN mais contenant les protéines d'échafaudages, sont comparables de par leur composition polypeptidique aux prétêtes du phage P22.

Le mode d'action des polypeptides 50 K et 33 K, ainsi que les interactions qu'ils pourraient engendrer avec des protéines de structure n'ont jamais été décrits.

f) Intermédiaires lourds

Deux pics de sédimentation de 600 S et 750 S sont observés après purification sur gradient de saccharose d'une culture cellulaire infectée par l'adénovirus sauvage (D'HALLUIN et al., 1978b).

La population 750 S après fixation au DMTB et purification sur gradient de CsCl s'équilibre à la densité 1,34, densité du virus infectieux. Celle de 600 S s'équilibre en deux pics de densités 1,31 et 1,37.

Le pic de densité 1,31 est représenté par les capsides vides. L'espèce lourde s'équilibrant à 1,37 a une composition polypeptidique différente de celle des virions matures et des capsides vides. En effet, les protéines d'échafaudage 50 et 39 K sont absentes, par contre, l'ADN viral est présent mais non encore associé aux protéines du nucléoïde.

g) Insertion de l'ADN viral

HAMMARSKJOLD et WINBERG (1980) travaillèrent sur deux souches différentes d'Ad16. La première souche était purifiée par plages ; la seconde, obtenue après de multiples passages, avait une duplication des 390 paires de bases de l'extrémité gauche du génome à l'extrémité droite.

L'ADN de la souche purifiée par plages pénètre dans la capside par son extrémité gauche. Par contre, pour la seconde souche, la pénétration se produisait, de façon équivalente, par l'une ou l'autre extrémité. Ceci leur permet de conclure que le signal d'encapsulation de l'ADN viral était localisé entre les 100 et 390 premiers nucléotides de l'extrémité gauche du génome. Les mutants thermosensibles affectés dans les régions L1 et L5 ne peuvent emballer leur ADN. Or leur expression est bloquée au niveau des zones apicales de la particule. Il est possible que l'ADN viral pénètre dans les capsides à ce niveau.

h) Les jeunes virions

Le mutant thermosensible H2 ts 1 accumule à température non permissive des particules de même densité que le virion mature mais non infectieuses (WEBER, 1976).

L'analyse de ces particules appelées virions immatures ou jeunes virions révèle que les précurseurs polypeptides pVI, pVII, pVIII, pIIIa et pTP ne sont pas clivés, par ailleurs aucun polypeptide de faible masse moléculaire (X-XII) n'est décelé.

Le clivage protéolytique de ces précurseurs se réalise lors du passage de la culture cellulaire infectée par H2 ts 1 à température permissive. Une progéniture virale infectieuse est alors produite (WEBER, 1976).

La mutation de H2 ts 1 fut localisée à la position 60 UG par analyse, par enzymes de restriction, d'espèces recombinantes (HASSEL and WEBER, 1978) et à la position (22191) par séquençage de l'ADN de la région mutée. Le gène défectif de H2 ts 1 est celui de la protéase virale, la 23 K, qui est l'un des produits de la région L3 (AKUSJARVI et al., 1981).

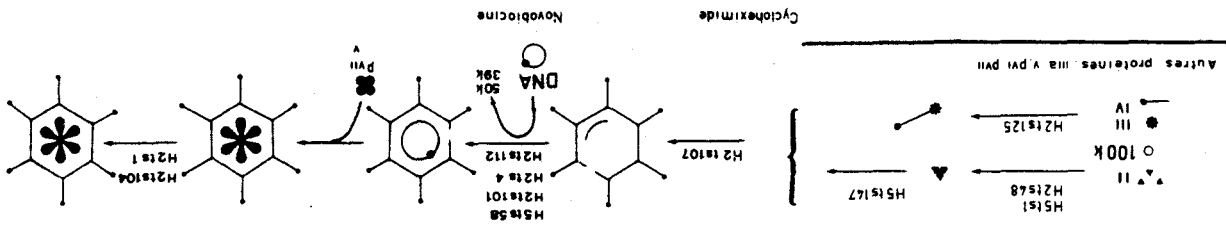
#### i) Conclusion

Les étapes générales de l'assemblage de l'adénovirus sont globalement connues et plusieurs modèles ont été proposés. Néanmoins certains points restent imparfaitement compris.

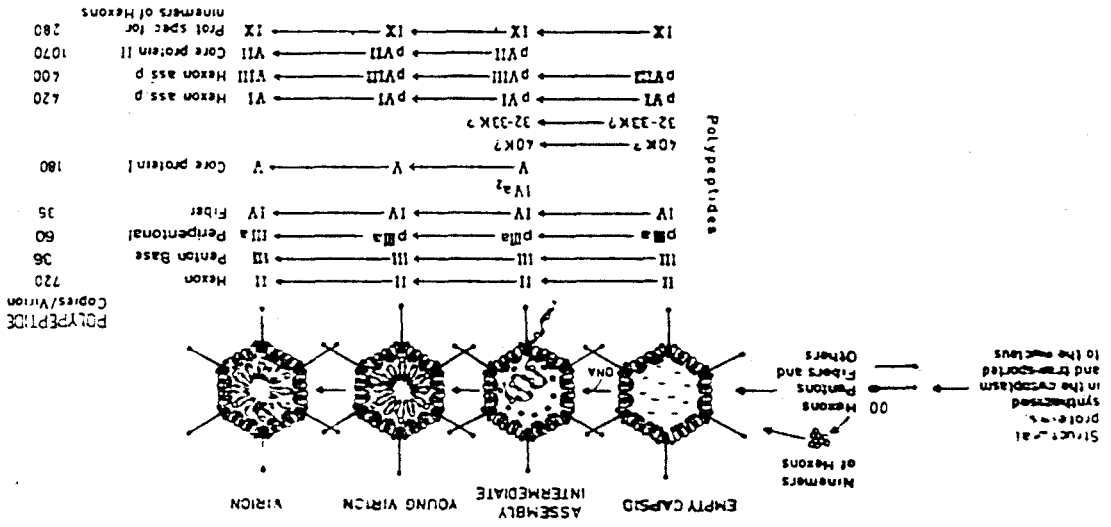
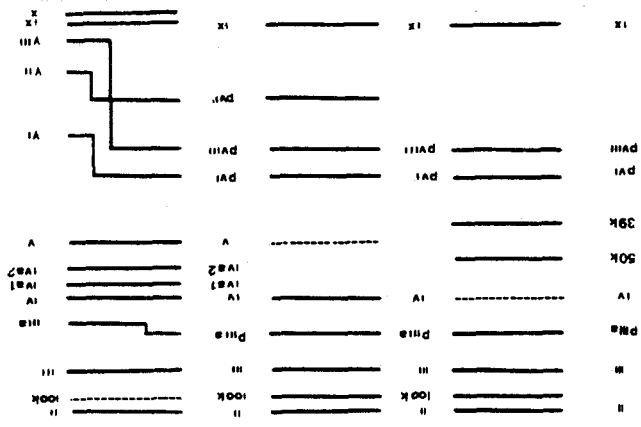
Nous citons l'exemple de la cinétique d'encapsidation des protéines du nucléoïde et l'existence d'intermédiaires d'assemblage lourds en découlant (Cf. Fig. 13 a et b : schémas d'assemblages d'après D'HALLUIN et al., 1978a,b ; Thèse d'Etat (1980) et PHILIPSON, 1983). De même le rôle des polypeptides pVI et pVIII est mal connu. Enfin, la nature des interactions des protéines d'échafaudage avec les protéines de structure n'a pas encore été décrite.



PROTEINES DE STRUCTURE



Virion mature d = 1.345  
 Jeune virion d = 1.345  
 Inter-mediaire d = 1.37  
 Inter-mediaire Leger d = 1.315



POLYPEPTIDE Copies/Virion  
 II 720  
 III 36  
 IIIa 60  
 IV 35  
 V 180  
 VI 420  
 VII 400  
 VIII 1070  
 IX 280

Figure 13 : a : Modèle d'assemblage d'après D'HALLUIN, Thèse d'Etat (1980).  
 b : Modèle d'assemblage d'après PHILIPSON (1983).

APPENDICE TECHNIQUE

## 1- Culture cellulaires et virales

- les cellules KB sont cultivées en suspension, dans des spinners, sur milieu F13 (Joklik modifié) (DIFCO) contenant 5 % de sérum de cheval.
- les lignées cellulaires de HeLa, 293 (cellules HEK transformées par l'Ad5) et Hep2 sont cultivées en monocouches sur milieu Dulbecco contenant 10 % de sérum de veau foetal.
- les différents stocks d'adénovirus sauvage et d'adénovirus mutants ont été titrés par plage de lyse (D'HALLUIN et al., 1982).
- les mutants thermosensibles H2 ts 107, H2 ts 118, H2 ts 121 ont été obtenus dans notre laboratoire (MARTIN et al., 1978), par traitement d'un stock d'adénovirus sauvage par l'acide nitreux. Le mutant H5 ts 1 nous a été donné par le Dr. Joe Weber (Sherbrooke, Canada).

Lors de l'infection, la culture cellulaire est centrifugée à 2000 rpm, le culot cellulaire est repris dans du milieu frais, sans sérum (1/10 du volume initial). Les virus sont ajoutés pour avoir une multiplicité d'infection de 10 à 20 particules par cellule. Après une heure de pénétration, les cellules sont ramenées à une concentration normale par addition de milieu frais et de 2 % à 10 % de sérum.

## 2- Isolement et purification des différentes particules

Les cellules récoltées aux différents temps indiqués dans le texte, sont centrifugées à 2000 rpm. Le culot cellulaire est repris dans une solution de Tris HCl hypotonique, qui permet leur fragilisation. Trois cycles de congélation décongélation, permettent la rupture des membranes. Enfin, une lyse totale est effectuée par addition d'un volume égal de Fréon 113 (BOUDIN et al., 1980) et le broyage du mélange. Par centrifugation, à 10000 rpm pendant 20 mn dans des tubes corex, la majorité des membranes sont éliminées.

La phase aqueuse contenant les particules (IM et virions) est prépurifiée par centrifugation sur rotor TST 60 Kontron à 32000 rpm, 1 heure, sur un coussin de CICs (d1,43).

Les bandes de particules sont alors séparées lors d'une deuxième centrifugation sur un gradient discontinu de CICs constitué de 3 couches successives de 1 ml. Respectivement, solution de CICs de densité 1,45 dans 40 % glycérol ; solution de CICs de densité 1,33 dans 20 % de glycérol ; solution de CICs de densité 1,25 dans 5 % de glycérol). La séparation des particules est effective après 3,5 h à 38000 rpm et à 4° C, dans un rotor TST 60 (Kontron).

Le gradient discontinu est remplacé, dans certaines expériences, par une ultracentrifugation de 16 h, à 35000 rpm dans le rotor TST 60, du mélange de particules dans une solution de CICs à une densité finale de 1,34 (le gradient dans ce cas est autotransformant).

Les particules peuvent alors être déposées sur gel de polyacrylamide SDS.

### 3- Conditions de marquage

#### a) Marquage avec différents acides aminés marqués

Dans tous les marquages effectués avec un acide aminé radioactif, les cellules sont préalablement centrifugées à basse vitesse (2000 rpm), le culot cellulaire est lavé une fois dans du milieu de culture dépourvu en l'AA qui sera ajouté sous forme marquée ultérieurement. Les cellules sont resuspendues à haute concentration ( $10^7$  cellules par ml), dans ce même milieu. L'AA marqué (Val  $^{14}\text{C}$ , Val  $^3\text{H}$ , Meth  $^{35}\text{S}$ ), est alors ajouté, pendant le temps et à la température indiquée dans le texte.

Les cultures cellulaires sont chassées, par dilution des cellules jusqu'à une concentration normale de  $5 \cdot 10^5$  cellules par ml, dans du milieu frais contenant un excès (10 fois) de l'AA froid correspondant au marqueur.

#### b) Marquage à l'acide phosphorique $^{32}\text{P}$ (NEN)

Le marquage de particules à l'acide phosphorique dans les cultures cellulaires est réalisé par incubation des cellules (concentration  $2 \cdot 10^5$  cellules par ml), dans un milieu sans phosphate, contenant 2 % de sérum de veau dialysé et une concentration de 100  $\mu\text{Ci/ml}$  de phosphate  $^{32}\text{P}$ .

c) Marquage à l'acétate  $^{14}\text{C}$  (CEA, Saclay)

Ce marquage est réalisé par simple addition au milieu de culture des cellules infectées d'acétate de sodium  $^{14}\text{C}$  à une concentration de 10  $\mu\text{Ci/ml}$ , pendant des temps s'échelonnant de 2 à 16 heures après infection.

4- Rupture des particules virales - isolement des sous-structures

Trois zones morphologiques sont identifiables sur la capside, il s'agit des zones apicales, des faces et du nucléoïde.

L'action d'un détergent doux, le déoxycholate de sodium (DOC) à 0,5 %, à 56° C pendant 90 secondes, permet la dissociation des virions en 3 entités (BOULANGER et al., 1979).

- . les groupes de 9 hexons de faces
- . les zones apicales
- . les nucléoïdes

Ces trois structure sont ensuite séparées grâce à leur différentes vitesses de sédimentation, sur gradient continu 10-40 % de glycérol, pendant 90 mn à 4° C et à 35000 rpm sur rotor SW41 (Beckman) (BOULANGER et al., 1979).

5- Dissolution des gels d'acrylamide et comptage

L'électrophorèse, suivant la méthode de Laemmli (1970), des polypeptides viraux a lieu sur gel d'acrylamide 17,5 % (rapport acrylamide, bisacrylamide 50/0,235) contenant du SDS.

La position des polypeptides des différents échantillons est déterminée par comparaison avec celle des polypeptides d'un virus marqueur, dont la piste de migration est colorée.

Chaque piste de gel est découpée en bandes de 2 mm qui sont alors dissoutes à température ambiante pendant 1 heure dans un mélange d'acide perchlorique à 60 % (0,2 ml) et d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 30 % (0,4 ml).

L'analyse de l'incorporation est alors effectuée par comptage de chaque échantillon (dissout dans un liquide scintillation pour milieu liquide : Aqualyte) dans un spectromètre à scintillation préalablement étalonné.

6- Méthodes biochimiques générales pour la caractérisation de H2 ts 107

a) Assemblage des hexons trimères

Les hexons trimères ont une vitesse de sédimentation de 12 S, et sont donc aisément séparables des polypeptides II monomériques sédimentant à 3,5 S par ultracentrifugation. Les cellules infectées sont récoltées à la 20e heure, après l'infection. Les culots cellulaires sont repris dans un tampon Tris HCl hypotonique, congelés décongelés 3 fois et soniqués 3 fois 10 secondes, les extraits lysés sont déposés sur gradient sucrose 5-25 % et ultracentrifugés à 49 K, à 4° C, pendant 21 h dans un rotor SW50 (Beckman) (LEMAY et BOULANGER, 1980).

b) Composition peptidique de la look et de la sok

La composition peptidique de la 100 K a été comparée à celle de la 90 K par la technique de CLEVELAND et al. (1977). L'enzyme protéolytique utilisée à des concentrations croissantes était la protéase V8 de staphylococcus aureus.

7- Techniques pour la caractérisation génétique de H2 ts 107

a) Complémentation

Les tests de complémentation entre les différents mutants ont été réalisés suivant la technique décrite par MARTIN et al. (1978).

b) Recombinaison

Les cellules HeLa sont co-infectées à 33° C par deux mutants H2 ts 107 et H5 ts 1 à des concentrations de 10 particules infectieuses de chaque mutant par cellule. Les cellules sont récoltées à la 96e heure, le culot cellulaire obtenu après centrifugation à 2000 rpm, est repris dans du Tris hypotonique et est congelé décongelé 3 fois.

Des dilutions de ces lysats cellulaires sont utilisées pour infecter des cellules HeLa à 33 et 39° C. Après pénétration, un milieu F13 gélosé contenant 5 % de sérum de veau foetal est ajouté dans les boîtes.

Après quelques jours, des plages de lyse sont obtenues. La fréquence de recombinaison correspond au rapport du nombre de plages virales obtenues à 39° C sur le nombre le nombre de plages obtenues à 33° C.

c) Techniques de "marqueur rescue"

Les cellules sont transfectées par du complexe purifié ADN-Protéine Terminale de H2 ts 107 et par des fragments d'adénovirus sauvage (soit intégrés préalablement dans des plasmides, soit purifiés après coupure du génome sur gel d'agarose), suivant la technique de précipitation au phosphate de calcium (ARRAND, 1978).

d) Séquençage par la méthode des didéoxy

Les fragments d'ADN de H2 ts 107 ont été clonés dans les vecteurs M13 Mp18 et M13 Mp19 suivant les techniques développées par MESSING (1983).

L'ADN des clônes viraux obtenus a été séquencé suivant la méthode de SANGER et al. (1977).

8- Réalisation des tests immunologiques

Les polypeptides 100 K et 90 K, découpés sur gel de polyacrylamide, ont été transférés électriquement sur nitrate de cellulose.

Pour la localisation de polypeptides 100 K et 90 K dans les capsides, les IM, préalablement "cassés" au DOC, sont immunoprécipités par les différents séra suivant la méthode de KESSLER (1975), puis déposés sur gel de polyacrylamide SDS et autoradiographiés.

Lors du test des séra anti 100 K N, anti 100 K W et anti 90 K, les IM purifiés sont cassés au DOC et déposés sur gel d'acrylamide. Les gels sont transférés électriquement (TOWBIN et al., 1977). Les complexes immunoprécipité sont soit mis en évidence par addition de complexe IgG de mouton anti lapin couplé à la peroxydase (IPF), soit grâce à la protéine A de staphylococcus auréus marquée à l'iode 125.

## 9- Tests immunologiques

Ces tests sont réalisés suivant la technique de double coloration des cellules. Après fixation au méthanol, les cellules sont incubées avec un sérum anti-hexon (synthétisé chez le lapin), après plusieurs lavages, le sérum de mouton anti-lapin est ajouté suivant la technique décrite par CEPKO et SHARP (1983).

## 10- Chromatographie d'affinité

### a) Préparation du matériel pour les colonnes d'affinité

Les cellules infectées ou non infectées sont marquées à la Meth  $^{35}\text{S}$  de la 2e à la 16e heure du cycle infectieux à température restrictive. Après centrifugation les culots cellulaires sont repris dans une solution 10 mM Tris HCl pH 8,1, et conservés ainsi 1/2 h à +4° C. Les lysats sont alors soniqués (3 X 5 secondes) avec une sonde Branson, après addition d'un demi volume de NaCl 5 M, une deuxième sonication est effectuée. Les extraits sont centrifugés à 10000 g 30 mn. Le surnageant est dialysé contre le tampon HEKT d'équilibrage des colonnes (25 mM Hepes, pH 6,8 ; 50 mM KCl ; 2 mM EDTA ; 10 % éthylène glycol ; 2 mM thioglycérol ; 0,1 mM PMSF). Une deuxième centrifugation de 30 mn à 10000 g a lieu, puis 40 à 50.10<sup>6</sup> cpm des surnageants obtenus, sont injectés sur chaque colonne.

### b) Synthèse de l'hexon sépharose

Le gel de sépharose 4B (pharmacia) est activé au bromure de cyanogène. Un même volume (7 ml) d'hexon capsomérique (1,5 mg/ml) est alors ajouté (ARNDT JOVIN et al., 1975).

Pour la colonne dénaturée, le gel d'hexon sépharose est chauffé 5 mn à 100° C. L'état physique de l'hexon lié au sépharose est contrôlé pour les deux colonnes par addition d'anticorps anti hexon capsomérique : 0,5 ml de sérum est dilué au 1/2 dans du tampon HEKT, puis injecté sur les colonnes (seringues de 5 ml) d'hexon sépharose.

Les colonnes tests sont successivement élués par les tampons suivants HEKT ; HEKT + 0,8 M KCl ; 0,2 M Gly HCl pH 7,8. Les éluats sont testés



pour leur teneur en anticorps anti hexon suivant la méthode de test ELISA. De cette façon, pour la colonne dénaturée 72 % des anticorps anti hexons étaient élués dans le pic exclu ; pour la colonne native, 85 % d'anticorps anti hexons étaient élués avec le tampon gly HCl pH 2,8 et les 25 % restants avec le tampon HEKT + 0,8 M KCl.

Les deux colonnes, lors des expériences d'infection d'extraits cellulaires infectés par H2 ts 121, sont éluées par les tampons suivants : HEKT ; HEKT + 0,2 M KCl ; HEKT + 0,8 M KCl ; HEKT + 0,8 M KCl + 5 M urée.

### C- Synthèse de la novobiocine sépharose

Deux grammes de CH sépharose 4B (Pharmacia) ont été mélangés après lavage dans une solution 0,5 M NaCl, avec 1 mMole de novobiocine dissoute dans de l'eau à pH 4,5 (l'acidification de l'eau est réalisée par addition d'acide acétique).

La réaction de couplage entre le mélange novobiocine sépharose et un ml de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride a lieu pendant 16 heures à température ambiante et sous agitation douce.

Le gel est lavé après le couplage par, successivement, : 1 M NaCl ; 1 M NaCl, 0,1 M Tris HCl pH 8,0 ; 1 M NaCl ; 0,05 M sodium formiate pH 4 ; 0,1 M Tris HCl pH 8,0 ; HEKT.

Après injection du matériel à tester (extrait de cellules non infectées ; infectées par Ad2 WT ou par H2 ts 107). L'élution de la colonne est réalisée par les tampon HEKT ; HEKT + 0,1 mg par ml de novobiocine ; HEKT + 20 mM ATP + 25 mM acétate de magnésium ; HEKT + 0,8 KCl ; HEKT + 0,8 M KCl + 5 M urée.

TRAVAUX PERSONNELS

## I- INTRODUCTION

Lorsque nous avons débuté ce travail, nous nous intéressions aux différentes étapes de la morphogénèse des particules virales. Nous voulions éclairer le rôle de certaines protéines dans l'échafaudage du virus. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une cinétique d'entrée de polypeptides dans la capsid virale. Par ailleurs, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la protéine non structurale tardive 100 K dont certaines propriétés sont comparables à celles de la protéine d'échafaudage gp8 du phage P22. Nous avons montré que la 100 K est une protéine possédant des domaines distincts intervenant dans différents mécanismes lors du processus d'assemblage.

## II- ASSEMBLAGE DES PARTICULES

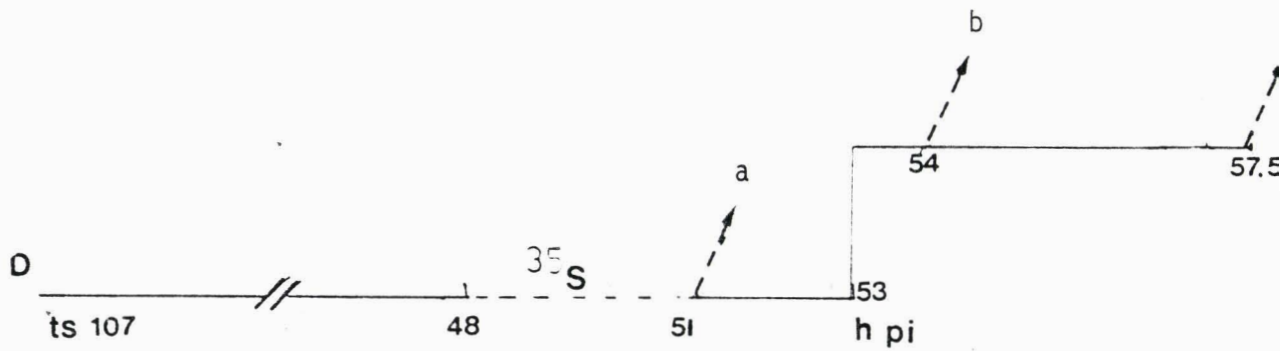
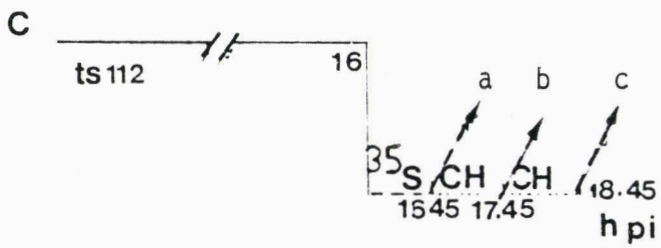
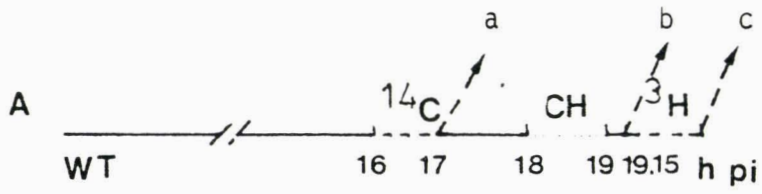
### A- Etudes préliminaires

Il n'existe pas de système d'assemblage "in vitro" de capsides complètes chez l'adénovirus, contrairement à ce qui a pu être obtenu chez le phage P22 (POTEETE et al., 1979). Seules quelques étapes, telles que l'autoassemblage des groupes de 9 hexons (PEREIRA and WRIGLEY, 1974) ou l'assemblage de la base et de la fibre en penton complet (BOUDIN and BOULANGER, 1982) furent réalisées "in vitro".

C'est pour cette raison que nous avons tenté de développer un système de maturation de particules vides "in vitro". Des extraits de noyaux de cellules infectées à température restrictive par un mutant accumulant des capsides vides ont été incubés avec des extraits cytoplasmiques de cellules infectées par Ad2WT.

Malgré la variation de nombreux paramètres (température, conditions ioniques et pH, temps d'infection des cellules), aucune particule infectieuse ne put être mise en évidence.

Nous avons alors essayé de mettre en évidence des structures préassemblées en utilisant le mutant thermosensible H2 ts 107. Ce mutant ne forme pas de capsid à température restrictive, néanmoins il synthétise ses protéines tardives qui présentent un profil antigénique normal. Nous avons employé différentes techniques douces d'extraction de noyaux et de gradients de saccharose ou de ficoll (D'HALLUIN et al., 1978a ; EDVARDSSON et al., 1976), mais aucune prestructure n'a été identifiée.



**TABLEAU 3**

B- Cinétique d'incorporation des protéines virales dans la capsid  
d'adénovirus

BOULANGER et al. (1979) ont montré que la rupture des particules virales par le déoxycholate de sodium produit trois sous-structures séparables sur gradient de glycérol. Ce sont respectivement :

- les zones apicales ou apex qui sont composés des hexons péripentonaux, des bases et des fibres ainsi que des polypeptides IIIa.

- les groupes de 9 hexons qui sont formés des hexons des faces, et des polypeptides IX.

- les nucléoïdes qui sont uniquement présents dans les virions infectieux et qui résultent de l'association de l'ADN viral avec les polypeptides V et VII.

Les polypeptides VI, VIII qui appartiennent structurellement aux groupes de 9 en sont dissociés par le déoxycholate de sodium, et sédimentent avec les apex.

1) Répartition du marquage dans les sous-structures de capsides

Cette méthode d'analyse, combinée à des expériences de marquage bref et de chasse, nous a permis de préciser l'ordre d'assemblage des polypeptides lors de la formation de la capsid. Notre but était d'analyser l'évolution de l'incorporation de la radioactivité dans les sous-structures. L'expérience consistait (Cf. Tableau 3A) à infecter une culture cellulaire par de l'adénovirus 2 type sauvage (Ad2 WT), puis à marquer radioactivement les cellules, entre la 16e et la 17e h, par de la  $^{14}\text{C}$ -valine. Après un premier prélèvement effectué (a) à la 17e heure, la culture subissait une chasse par addition de valine non radioactive jusqu'à la 18e heure. On ajoutait alors de la cycloheximide qui empêche la formation de nouveaux intermédiaires d'assemblage. Après une heure de ce blocage, soit à la 19e heure, un nouveau prélèvement avait lieu (b) suivi d'un second marquage à la  $^3\text{H}$ -valine pendant une heure supplémentaire et d'un dernier prélèvement (c) (Cf. Tableau 3A).

Après purification, les particules étaient dissociées au déoxycholate de sodium, et les sous-structures ainsi obtenues étaient séparées sur gradient de glycérol.

a) Analyse des populations virales matures

La formation des capsides vides nécessite 60 à 80 mn (D'HALLUIN et al., 1978a). Leur maturation en virus requiert une quarantaine de minutes supplémentaires (WEBER and KHITTOO, 1983).

L'analyse des populations virales obtenues, dans les prélèvements a et c (Cf. Fig. 14 a et c) montre que la radioactivité  $^{14}\text{C}$  en (a) et  $^3\text{H}$  en (c) est essentiellement localisée au niveau des zones apicales. Or ces populations proviennent d'intermédiaires débutés avant la période de marquage. Les sites d'incorporation de ces radioactivités ( $^{14}\text{C}$  en (a),  $^3\text{H}$  en (c)) sont donc représentatifs des dernières structures incorporées dans les capsides.

Le profil de la courbe b (Fig. 14b) montre que les groupes de 9 hexons sont davantage marqués que dans les cas précédents. Le rapport d'incorporation dans les trois sous-structures se rapproche du rapport observé lors d'un marquage continu d'une culture infectée (32 % apex ; 46,3 % groupe de 9 hexons ; 21,3 % nucléoïde). En fait, cette courbe représente une moyenne entre des populations dont l'assemblage a débuté avant le 1er marquage et pendant le 1er marquage.

b) Analyse des intermédiaires d'assemblage

Le blocage à la cycloheximide empêche la formation de nouveaux IM (SUNDQUIST et al., 1973), la population d'intermédiaires de maturation que l'on visualise en (b) (Fig. 14b) représente donc les anciens IM débutés lors du marquage  $^{14}\text{C}$ .

Par contre, dans les profils a et c (Fig. 14 a et c), on note une très forte incorporation de radioactivité au niveau des zones apicales. Cette radioactivité correspond à l'achèvement de la construction des capsides d'IM. Le matériel protéique constituant les zones apicales du virus a donc été apporté en dernier dans les précapsides.

2- Analyse polypeptidique des sous-structures virales

L'analyse des espèces polypeptidiques marquées dans chacune des sous-structures précédemment isolées sur gradient de glycérol, fut réalisée par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS. Les bandes des gels étaient découpées et dissoutes et la radioactivité de chaque fraction mesurée après étalonnage.

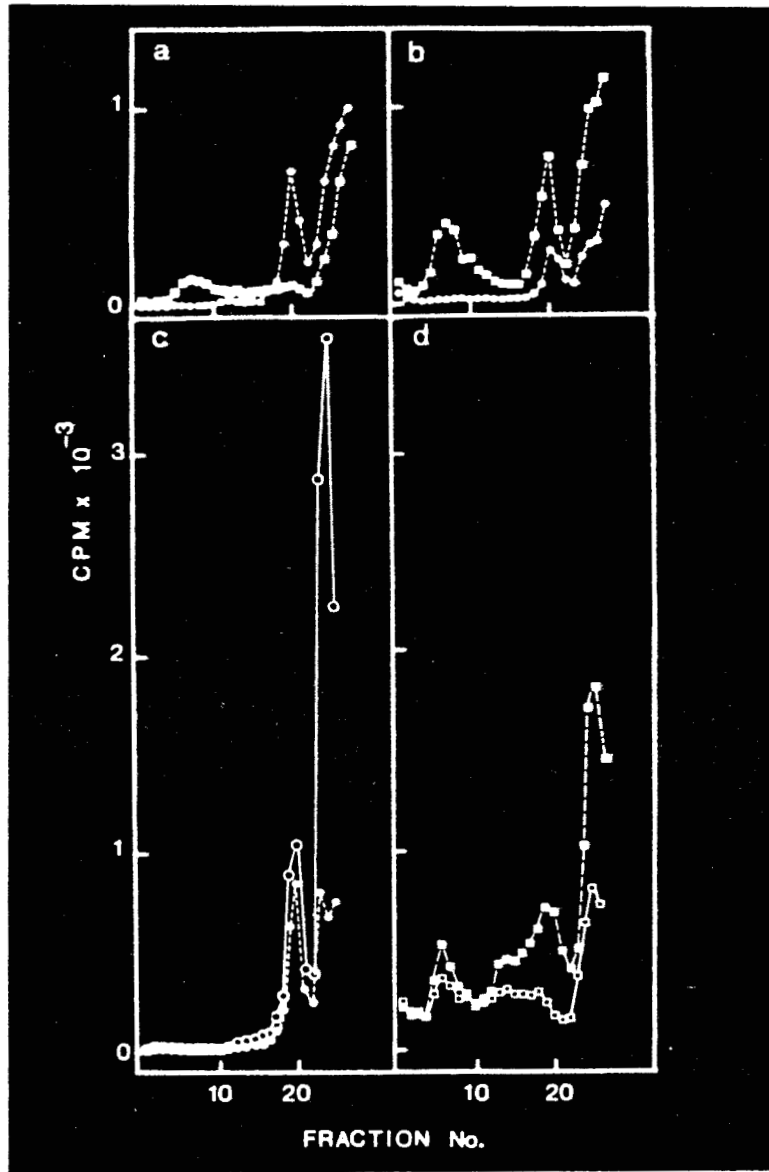


Figure 14 : Incorporation de  $^3\text{H}$ -valine et de  $^{14}\text{C}$ -valine dans les IM et les virus d'Ad2WT

- a : Prélèvement a après le 1er marquage
- b : Prélèvement b après le blocage cycloheximide
- c : Prélèvement c après le 2ème marquage

●—●	IM $^{14}\text{C}$ -Val	○—○	IM $^3\text{H}$ -Val
■—■	Vir $^{14}\text{C}$ -Val	△—△	Vir $^3\text{H}$ -Val

a) Analyse des protéines marquées de la population virale équilibrée à  $d : 1,34$

Après le premier marquage (Cf. Fig. 15 a,b,c), la composition polypeptidique de chacune des fractions virales isolées est qualitativement normale. Néanmoins, quantitativement, on observe une incorporation très forte dans les polypeptides IIIa, IV de la zone apicale. Le rapport au marquage du II de la même zone est infiniment supérieur au rapport théorique.

Comme nous l'avons vu, les particules infectieuses et les jeunes virions recueillis à ce point ont commencé à s'assembler avant le marquage. La localisation de la radioactivité est donc représentative de protéines incorporées tardivement.

Dans la figure 15 (courbes g, h, i), la surimposition du marquage  $^3\text{H-Val}$  très récent n'est révélée qu'au niveau des polypeptides V et pVII. Il est intéressant de constater que ces polypeptides ne sédimentent pas dans la zone des nucléoïdes, mais au niveau des groupes de 9 hexons (h) qui ont une vitesse de sédimentation de 30 à 50 S.

Ceci signifie que lors de l'évolution d'un IM "terminé" en un jeune virion, aucun polypeptide nouveau, mis à part le couple V - pVII, ne pénètre dans la capsid. La sédimentation inhabituelle du V et du pVII avec les groupes de 9 hexons peut s'expliquer par une association V-pVII-ADN, ne possédant pas encore une structure nucléoïque vraie.

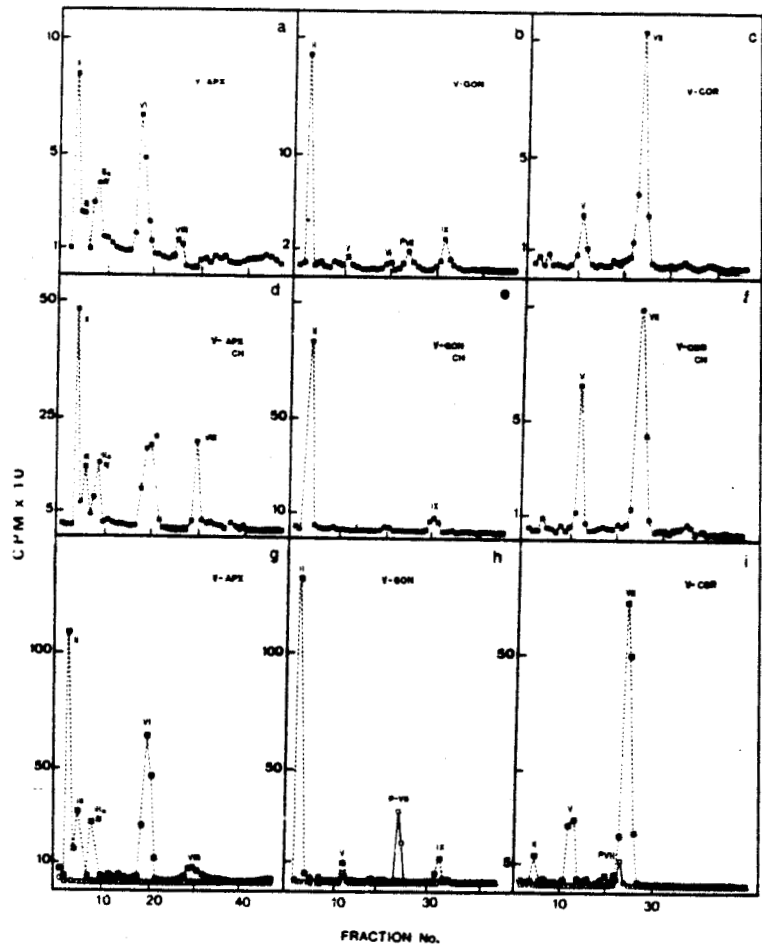
Cela confirmerait l'existence d'un "pré-nucléoïde" où la liaison ADN-pVII n'est pas aussi forte qu'après le clivage protéolytique du pVII en VII.

b) Analyse des protéines marquées dans les populations de capsides vides

Dans le profil des zones apicales isolées après le premier marquage (Cf. Fig. 16a), l'incorporation de la  $^{14}\text{C-valine}$  se répartit entre les polypeptides II, III, IIIa, IV et pVI - pVIII ; en outre, un pic important correspondant à la protéine d'échafaudage 50 K est également visible. Dans les groupes de 9 hexons (Cf. Fig. 16b), le profil obtenu est composé des polypeptides II et IX.

Lors du blocage par la cycloheximide (Cf. Fig. 16c,d), on observe une diminution de l'incorporation dans toutes les protéines virales. Cependant les pics d'hexons diminuent beaucoup plus drastiquement que ceux représentant les polypeptides pVI, pVIII et IIIa.





**Figure 15 :** Incorporation de la  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$ -valine dans les polypeptides des virus matures, déterminée après dissolution des bandes de gel de polyacrylamide.

a, b, c : prélèvement après le 1er marquage  $^{14}\text{C}$ -Val

d, e, f : prélèvement après le blocage cycloheximide

g, h, i : prélèvement après le 2ème marquage  $^3\text{H}$ -Val

■ — ■  $^{14}\text{C}$ -Val                      □ — □  $^3\text{H}$ -Val

Gon : groupe de 9 hexons ; Apex : Apex ; Cor : nucléoïdes (cores)

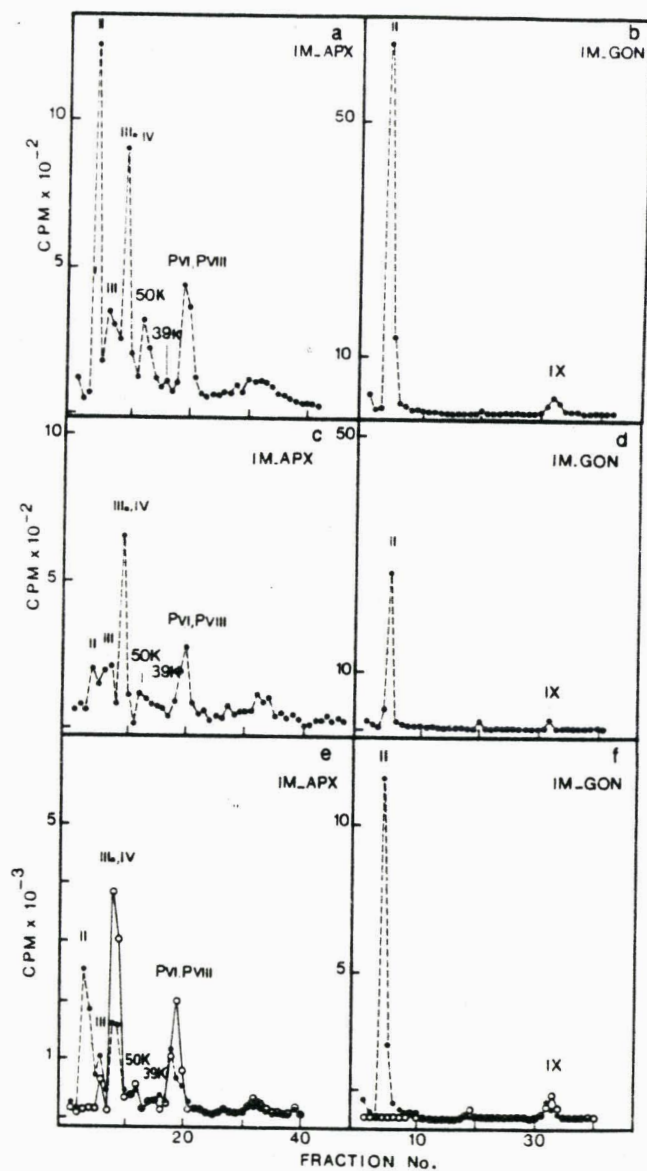


Figure 16 : Incorporation de la  $^3\text{H}$  et  $^{14}\text{C}$ -valine dans les polypeptides des IM, déterminée après dissolution des bandes de gel d'acrylamide  
 a, b : prélèvement après le 1er marquage  $^{14}\text{C}$ -Val  
 c, d : prélèvement après le blocage cycloheximide  
 e, f : prélèvement après le 2ème marquage  $^3\text{H}$ -Val

Enfin, après le deuxième marquage à la  $^3\text{H}$ -valine (Cf. Fig. 16e,f), aucune nouvelle radioactivité ( $^3\text{H}$ ) n'est incorporée dans les hexons, qu'ils soient des faces (groupe de 9, courbe f) ou des apex (e). Toute l'incorporation est localisée au niveau des polypeptides IIIa, pVI, pVIII et IX pour les protéines majeures ainsi que dans le doublet 50 - 39 K pour les protéines mineures.

L'ensemble de ces résultats suggère différentes interprétations possibles.

Le marquage extrême des zones apicales, par rapport au pourcentage effectif qu'elles représentent dans les capsides, peut signifier qu'il s'agit de régions très actives. Pour les intermédiaires de maturation, on peut imaginer qu'il existe un échange constant de ces zones avec le "stock" d'antigènes solubles non incorporés. Cette hypothèse ne peut cependant être appliquée aux virus qui sont des structures stabilisées.

La deuxième hypothèse est que l'échafaudage de la capside débute par les faces et s'achève avec l'apport des zones apicales nouvellement synthétisées et marquées à  $^3\text{H}$ -Val.

Plus spécifiquement au niveau polypeptidique, ces résultats suggèrent que les dernières protéines qui s'incorporent aux particules sont la IIIa associée aux apex, ainsi que les pVI-pVIII et la IX associées aux hexons des faces (EVERITT et al., 1975). L'arrivée tardive des polypeptides pVI et IX est en accord avec le rôle de stabilisation qu'on leur accorde.

Néanmoins, l'évolution permanente des différentes classes de particules au cours du temps rend l'interprétation de ces résultats difficiles.

C'est pourquoi nous avons analysé un système comparable, mais où l'utilisation de mutants thermosensibles permettait une double synchronisation des événements.

### C) Processus d'assemblage des capsides de H2 ts 112

H2 ts 112 est un mutant thermosensible isolé après sélection à l'acide nitreux (MARTIN et al., 1978). La mutation a été localisée dans la région L1 (D'HALLUIN et al., 1982), probablement sur le gène du polypeptide IIIa. H2 ts 112 accumule à température restrictive des IM, qui lors du passage des cellules à température permissive, peuvent se maturer en virus infectieux (D'HALLUIN et al., 1978b).

#### 1- Double synchronisation du système d'infection

Une culture cellulaire était infectée par H2 ts 112 à température non permissive, à la 16<sup>ème</sup> h un blocage à la cycloheximide était alors effectué

pendant une heure. A la 17e heure, la levée du bloc était immédiatement suivie d'un marquage bref de 20 minutes à la <sup>35</sup>S-méthionine. Un prélèvement était alors effectué. Une chasse de 2 heures avec excès de méthionine froide avait lieu sur la culture restante (Cf. Tableau 3B).

Les intermédiaires d'assemblage étaient purifiés et analysés en gel de polyacrylamide-SDS.

Le prélèvement effectué après le marquage (Cf. Fig. 17, ligne p) représente une population synchronisée par la mise en place du bloc cycloheximide. Le matériel radioactif incorporé est représentatif des polypeptides venant achever les préstructures bloquées jusqu'alors.

L'autoradiographie du gel révéla une incorporation importante dans les polypeptides IIIa, 50 K, mais aussi pVI, pVIII et pVII. Par contre, les protéines II, III et IV majeures en coloration au bleu de coomassie n'apparaissent que très peu radioactives.

Lors de la chasse (Cf. Fig. 17, ligne c), à température non permissive, le profil de l'autoradiographie reste globalement identique. Néanmoins, les polypeptides IIIa et 50 K que l'on visualisait dans le 1er prélèvement sous forme de doublets, ont évolué dans leur forme de plus haut poids moléculaire. Cette variation de migration électrophorétique provient probablement d'un changement du taux de phosphorylation de ces polypeptides.

L'absence d'incorporation de méthionine radioactive dans les polypeptides II, III, IV, 100 K et 39 K après le marquage bref tend à démontrer qu'une structure capsidique vieille composée de ces éléments est déjà formée. Cette structure pourrait être représentative d'une étape très précoce de l'assemblage où interviennent les polypeptides d'échafaudage 100 K, 39 K et également 50 K en moindre quantité. Les polypeptides marqués sur l'autoradiographie correspondraient à la dernière étape de formation de l'IM purifié par l'ultracentrifugation. Il y aurait donc arrivée tardive des polypeptides IIIa, pVI-pVIII, pVII, mais aussi de 50 K, ainsi que de 17 et 28 K.

L'obtention d'un profil d'incorporation similaire après la période de chasse détruit l'hypothèse selon laquelle les zones apicales seraient très actives et en échange constant avec le milieu extérieur. Si tel était le cas, la radioactivité incorporée, lors du marquage bref, particulièrement dans le IIIa, devrait décroître au cours de la chasse, lors des échanges se produisant avec les nouveaux polypeptides IIIa froids synthétisés, ce qui ne se produit pas.

Ces résultats ont été confirmés par un autre type d'expérience impliquant le mutant H2 ts 112.

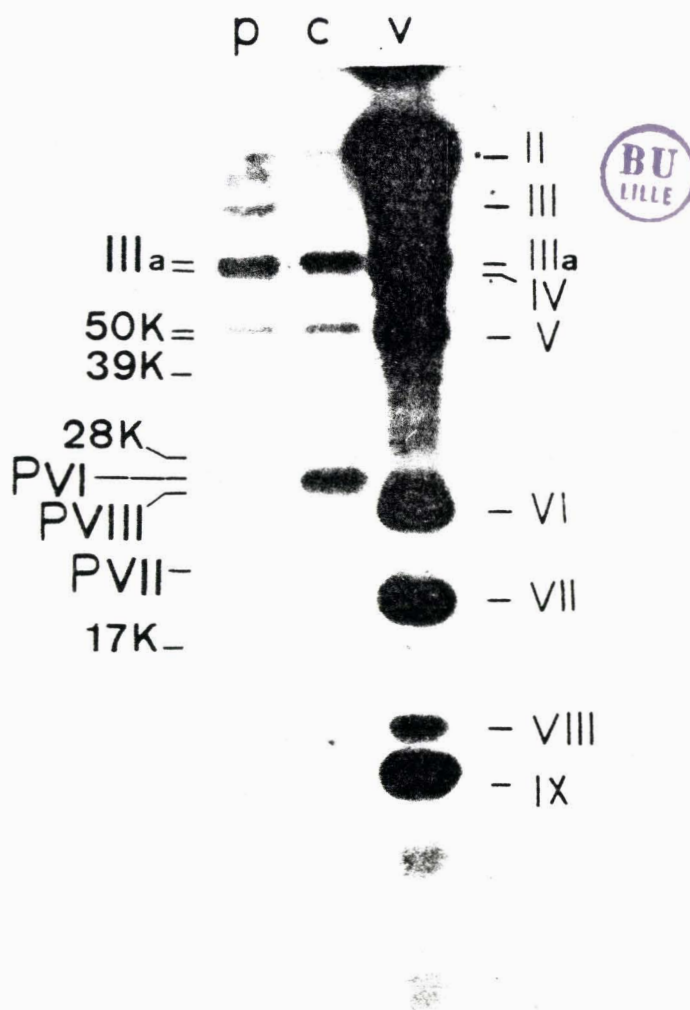


Figure 17 : Mise en évidence des derniers polypeptides incorporés dans les IM d'H2 ts 112.

Ligne P : prélèvement après le marquage bref

Ligne C : prélèvement après la chasse

V : virus Ad2 WT marqueur (<sup>14</sup>C-formiate)

2- Evolution des polypeptides marqués des particules de l'H2 ts 112, lors du blocage à la cycloheximide et des variations de température

Les cellules infectées par H2 ts 112 16 h à 39.5° C sont marquées à la <sup>35</sup>S-méthionine pendant 3/4 d'heure à 33° C ; après ce marquage, les biosynthèses protéiques sont inhibées par l'addition de cycloheximide à la même température. Des prélèvements sont effectués après le marquage et à 1 et 2 heures de chasse en présence de cycloheximide à la même température (Cf. Tableau 3C). Les populations d'IM et de virus sont analysées sur gel de polyacrylamide-SDS.

Après le marquage, les fractions récoltées lors de la purification à d : 1,345 ne révèlent aucune incorporation (Cf. Fig. 18A,B, Ligne a). Ceci est normal, dans la mesure où à peu près 40 mn sont nécessaires pour maturer un IM en virus à 37° C (à 33° C, le cycle est 2,5 fois plus long qu'à 39.5° C).

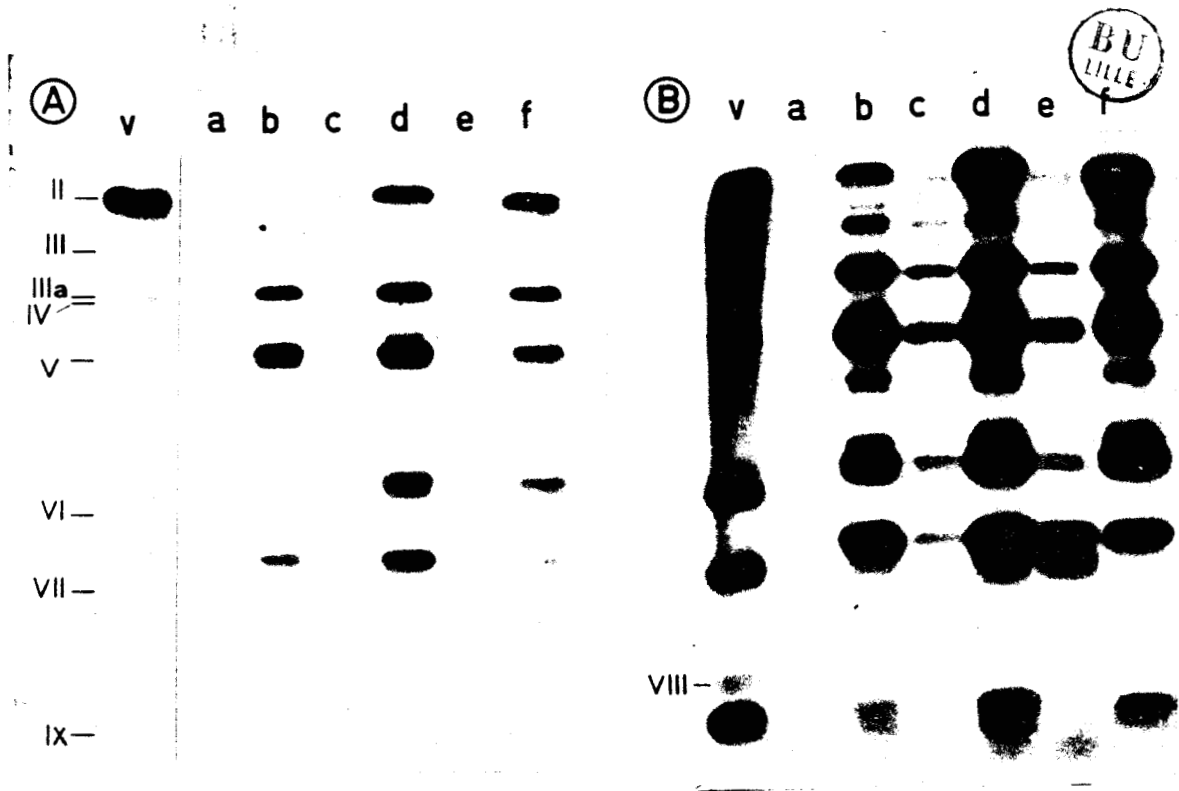
Après une heure de chasse à 33° C, on visualise les premiers virions formés (Cf. Fig. 18C, ligne c) à partir des intermédiaires froids assemblés à 39° C et avec le matériel radioactif synthétisé lors du marquage à 33° C. Les bandes les plus intenses sont celles du IIIa, du pVI, VII, pVIII et également du V-50 K. Cette répartition des polypeptides radioactifs reste semblable sur l'autoradiographie des particules de d : 1,34 obtenues après la 2e heure de chasse (Cf. Fig. 18B, ligne e). Cependant le clivage pVII → VII s'est alors produit et l'espèce 50 K a disparu. Les jeunes virions représentant la majorité de la population après une heure de chasse ont donc évolué en virions matures.

Les particules IM présentent un marquage beaucoup plus intense, compréhensible étant donné leur accumulation à 39.5° C (Cf. Fig. 18A, lignes b,d,f).

Immédiatement après le marquage (Cf. Fig. 18, ligne b), les polypeptides les plus marqués radioactivement sont le IIIa, le 50 K, le pVI, le pVIII et le pVII. Après une heure de chasse, nous observons une amplification du marquage (Cf. Fig. 18, ligne d). Mais après deux heures de chasse, beaucoup de vieux IM ayant déjà évolué en virions, et la synthèse de nouveaux IM étant inhibée, on observe une décroissance générale de la radioactivité.

D- Mise en évidence de l'incorporation différentielle de la radioactivité dans les deux espèces d'IM de H2 ts 107

Le mutant thermosensible H2 ts 107 ne peut assembler de particule à température restrictive. Néanmoins, le passage à la température permissive



**Figure 18 :** Incorporation de la  $^{35}\text{S}$ -méthionine dans les populations de H2 ts 112 après un marquage bref à température permissive suivi d'un blocage des biosynthèses protéiques à température permissive.

A : révélation après 16 h d'impression

B : révélation après 3 jours d'impression

ligne V : virus Ad2 WT marqueur ( $^{14}\text{C}$ -formiate)

lignes a, c, e : population des virus (d : 1,34) récoltés après le marquage (a), 1 heure de chasse (c), 2 heures de chasse (e)

lignes b, d, f : population d'IM (d : 1,29) récoltés après le marquage (b), 1 heure de chasse (d), 2 heures de chasse (f).

Tableau 4 : Cinétique d'incorporation dans les différentes particules d'H<sub>2</sub> ts 107 (Cf. Tableau 3D)  
en %

	densités des particules	
Temps de chasse et température	1,345	1,295
2 h (33° C)	8,2	27,1
2 h (33° C) + 1 h (39.5° C)	16,2	29,7
2h (33°C) + 3,5 h (39.5° C)	41,9	22,1
		64,6
		54,0
		35,9





d'une culture cellulaire infectée par ce mutant à 39° C pendant 16 h, autorise l'échafaudage de capsides à partir des antigènes solubles accumulés à 39.5° C.

Après ce changement de température, deux types de particules de  $d : 1,285$  et de  $d : 1,295$  peuvent être séparés sur gradient de CsCl. Leur composition polypeptidique et leur morphologie en microscopie électronique les rapprochent des particules vides isolées lors du déroulement du cycle de l'adénovirus sauvage et de nombreux mutants (EDVARDSSON et al., 1976 ; SUNDQUIST et al., 1973 ; D'HALLUIN et al., 1978a,b).

Pendant, l'existence d'un polypeptide de migration électrophorétique de 90 K différencie les capsides IM de H2 ts 107 de celles déjà isolées.

Nous pensions que des cellules infectées par H2 ts 107, à 33° C, pendant 48 h, puis marquées à la  $^{35}\text{S}$  Meth à cette même température, pendant 3 h, avant la chasse de la culture en présence d'un excès de méthionine froide, permettrait de visualiser les derniers polypeptides marqués pénétrant dans les préparticules avant le blocage de nouveaux assemblages lors du passage à température restrictive (Cf. Tableau 3D).

Les particules de  $d : 1,285$  isolées lors de la chasse (Cf. Fig. 19C, ligne c) possèdent un profil où les polypeptides II, 90 K, III, pVIII et pVII sont fortement marqués, alors que peu de  $^{35}\text{S}$ -méthionine est incorporée dans les polypeptides IIIa et 50 K. La deuxième espèce, de  $d : 1,295$  (Cf. Fig. 19, lignes a,b), montre un profil radioactif ne différant de la première que par l'augmentation très forte de l'incorporation de  $^{35}\text{S}$ -méthionine dans les polypeptides IIIa, 50 K, pVI. Nous avons vérifié que le blocage de l'échafaudage de nouveaux assemblages était effectif. En effet, la radioactivité totale incorporée dans l'ensemble des populations virales demeurait constante au cours de la chasse (Cf. Tableau 4). Par contre, l'examen de l'incorporation dans chaque espèce variait pendant ce même temps.

En effet, on observait d'abord une diminution de l'incorporation dans les IM de  $d : 1,285$  et que parallèlement elle augmentait dans les particules de  $d : 1,295$  ; avant de diminuer également au profit de la population virus mature ( $d : 1,34$ ).

Ces résultats suggèrent une évolution à 39.5° C entre les différents types de particules de H2 ts 107 déjà assemblées à 33° C. La variation de l'incorporation observée tend à exprimer une évolution entre les espèces allant des IM 1,285 → aux IM 1,295 et aux virus 1,34. La conséquence de cette évolution se traduit au niveau des polypeptides marqués (Cf. Fig. 19, lignes a,b,c) par l'arrivée tardive des polypeptides IIIa, 50 K, pVI et pVIII.

Les différents types d'approches utilisées dans cette étude nous permettent de déterminer une arrivée tardive des protéines des zones apicales et particulièrement du polypeptide IIIa dans les particules, ainsi que des protéines permettant la stabilisation de la capside 50 K, pVI, pVIII. Le travail sur l'assem-

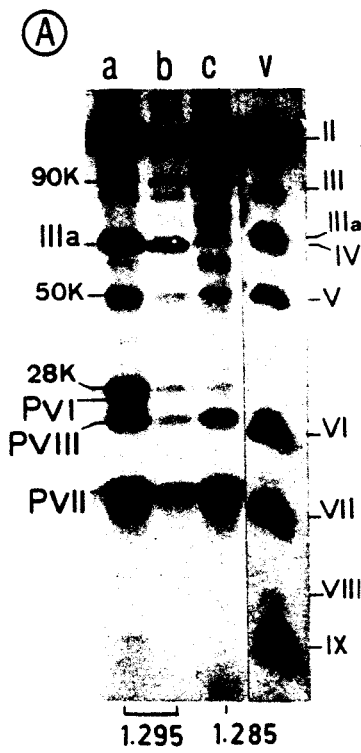


Figure 19 : IM d'H2 ts 107 purifiés après passage de la culture de 33 à 39.5° C.

lignes a, b : particules de d : 1,295

ligne c : particules de d : 1,285

ligne V : virus Ad2WT marqueur (<sup>14</sup>C-formiate)

Mutant	H2 ts 107	H5 ts 1	H2 ts 118	H2 ts 121	H5 ts 125
H2 ts 107	(1,2.10 <sup>4</sup> )	1,0	4,8	70	130
H5 ts 1		(3,7.10 <sup>2</sup> )	1,4	100	50
H2 ts 118			(3,5.10 <sup>2</sup> )	410	12
H2 ts 121				(1,4.10 <sup>3</sup> )	21
H5 ts 125					(4,5.30 <sup>2</sup> )



blage nous a amené à travailler avec le mutant H2 ts 107 qui nous est rapidement apparu extrêmement intéressant par son incapacité à former aucun préassemblage à température restrictive et par sa capacité à y synthétiser tous les polypeptides tardifs. Son phénotype suggérait une altération probable dans une protéine d'échafaudage intervenant dans les étapes très précoces de l'assemblage. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons voulu caractériser le mutant H2 ts 107.

### III- CARACTERISATION DE L'H2 ts 107. ROLES DE LA PROTEINE D'ECHAFAUDAGE 100K

#### A- Première caractérisation

##### 1- Complémentation

L'indice de complémentation entre deux mutants est défini par le rapport entre le taux d'expression virale dans des cellules coinfectées avec ces deux mutants thermosensibles à température restrictive sur la somme de l'expression de chacun des mutants, lors de la mono-infection des cellules :

$$CI = \frac{\text{Expression (tsX + tsY)}}{\text{Expression (tsX) + Expression (tsY)}}$$

On considère que deux mutants se complémentent lorsque le rapport CI est supérieur à 10.

Pour déterminer grossièrement la zone affectée de H2 ts 107, nous avons réalisé des tests de complémentation entre ce mutant et d'autres mutants thermosensibles déjà caractérisés. Nous avons choisi H5 ts 125 représentatif de la zone E2A (FROST and WILLIAMS, 1978) ; H5 ts 1 (ARRAND, 1978) et H2 ts 118 (D'HALLUIN et al., 1982), dont les mutations ont été localisées dans le gène de la 100 K ; H2 ts 121 muté dans la région L3, dans le gène de l'hexon.

Le tableau 5 résume les résultats que nous avons obtenus. H2 ts 107 est complémenté par H2 ts 121 et H5 ts 125 ; mais aucune complémentation ne s'effectue avec H2 ts 118 et H5 ts 1.

La mutation de H5 ts 1 a été localisée entre 70 et 73 UG, sur le gène de la protéine tardive non structurale 100 K.

Ce résultat nous a amené à tester l'hypothèse selon laquelle H2 ts 107 était affecté sur les étapes connues du cycle lytique impliquant la 100 K, soit la trimérisation ou le transport de l'hexon.

## 2- Trimérisation de l'hexon et son transport du cytoplasme au noyau

L'analyse en immunoélectrophorèse bidimensionnelle des antigènes solubles de H2 ts 107, synthétisés à température permissive (Cf. Fig. 20a) et restrictive (Cf. Fig. 20b) révèle des profils antigéniques normaux. La forte accumulation d'antigènes solubles, surtout des zones apicales, observée à 39.5° C, s'explique par le fait qu'aucun assemblage ne se produit à cette température.

L'ultracentrifugation en gradient de saccharose d'extraits de cellules infectées à température restrictive par l'H2 ts 107 et l'analyse des fractions récoltées en gel de polyacrylamide-SDS montrent que H2 ts 107 assemble à 39.5° C des hexons trimériques qui sédimentent à 12 S (Cf. Fig. 20 C). H2 ts 107 n'est donc pas affecté dans la fonction de trimérisation de l'hexon où, comme nous l'avons vu, la 100 K joue un rôle important.

Notre deuxième approche fut de vérifier si l'H2 ts 107 pouvait être affecté dans le transport de l'hexon entre le cytoplasme et le noyau. Pour cela, nous avons infecté des cellules HeLa à température restrictive par différents mutants affectés sur l'hexon (H2 ts 121) ; la 100 K (H2 ts 118, H5 ts 1, H2 ts 107) et par Ad2 WT.

Nous avons révélé les hexons synthétisés dans ces cultures par un sérum anti-hexon de lapin, puis ajouté un deuxième sérum anti IgG de lapin lié à la fluorescéine. La localisation de la fluorescence au sein des cellules visualisée au microscope, était le reflet de la localisation des hexons (Cf. Fig. 21, lignes a,b,c,d). Les cellules infectées par le mutant hexon(-) H2 ts 121, ne présentaient, comme les cellules non infectées, aucune fluorescence. Notre sérum était donc spécifique de l'hexon.

Les cellules infectées par H5 ts 1 n'ont révélé que quelques points de fluorescence très faible autour du noyau car notre sérum anti-hexon capsomérique ne réagit pas avec les monomères d'hexon. Ceci nous a permis de vérifier le rôle de la 100 K dans la trimérisation de l'hexon. En effet, H5 ts 1 est affecté sur cette fonction (Cf. Fig. 21b).

Le mutant H2 ts 118 (Cf. Fig. 21c) est capable de trimériser ses hexons, cependant nous n'avons observé qu'une fluorescence nettement périnucléaire. Aucun hexon trimère de H2 ts 118 ne semble pouvoir pénétrer dans les noyaux des cellules infectées. Ceci permet de confirmer le rôle de la 100 K dans le transport de l'hexon (TASSERON-DeJONG et al., 1979 ; GAMBKE and DEPPERT, 1981). La mutation de l'H2 ts 118 fut localisée dans le gène de la 100 K par des expériences de recombinaison génétique (D'HALLUIN et al., 1982).

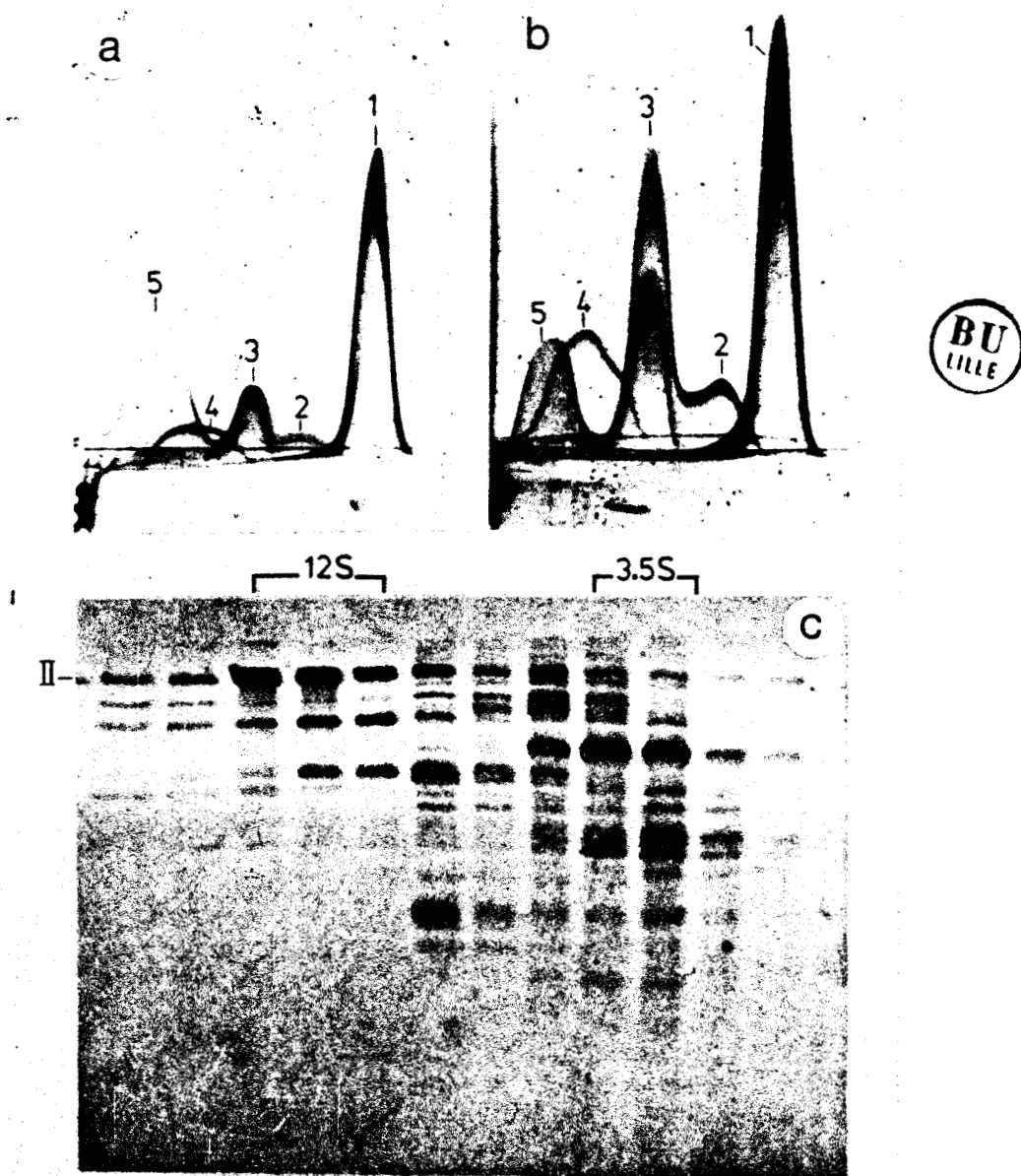


Figure 20 : Mise en évidence des trimères d'hexon chez le mutant H2 ts 107.

a : immunoelectrophorèse bidimensionnelle des antigènes solubles de H2 ts 107 à température permissive

b : immunoelectrophorèse bidimensionnelle des antigènes solubles de H2 ts 107 à température restrictive

- pic 1 : hexon
- pic 2 : base du penton
- pic 3 : penton
- pic 4 : IIIa
- pic 5 : fibre

c : analyse par électrophorèse, après séparation en gradient de saccharose, d'antigènes solubles de H2 ts 107 à 39.5° C

- piste 3,5 S : hexon monomère
- piste 12 S : hexon trimère

Tableau 6 : Analyse par des endonucléases de restriction de l'ADN de recombinants intersérotypiques entre des mutants ts de Ad2 et Ad5

Recombinant <sup>(b)</sup>	Designation	Bam HI	Hind III	Bam HI	Sma I	Sma I	Eco RI	Sma I	Eco RI	Hind III	Hind III	Eco RI	
		29.7	41.7	42.8	54	55.9	59.2	69	70.7	79.6	80.4	89.6	
H2 ts 107 x H5 ts 58	R6	2	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	
	R7	2	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5	
	R8	2	2	2	2	5	5	5	2	5	5	5	
H2 ts 107 x H5 ts 36	Ø1	2	2	2	5	5	5	5	2	5	5	5	
	Ø2	2	5	5	2	2	2	5	5	5	5	2	
	Ø3	2	5	5	2	2	2	5	5	2	2	2	
	Ø5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5 <sup>(c)</sup>	
	Ø7	2	2	2	5	5	2	5	2	5	5	5	
			Bam HI		Bam HI	Xho I		Eco RI	Xho I	Xho I	Eco RI		EcoRI
			29.7		42.8	53		59.2	68.4	70	70.7		89.6
H2 ts 107 x H5 ts 1	S1	2		2	5		5	5	2	2		2	
	S2	5		5	2		5	5	2	2		2	
	S5	5		5	5		5	5	2	2		2	
	S8	5		5	5		5	5	2	2		2	

- (b) Les nombres 2 et 5 apparaissant dans le tableau indiquent une séquence d'Ad2 ou d'Ad5 à cet unique site de clivage  
(c) La composition de l'ADN de Ø5 est celle d'un révertant

Tableau 6



D'autres expériences, par sauvetage de la mutation avec des fragments d'ADN du virus sauvage, ont permis de préciser entre 72,8 et 75,8 UG la région mutée.

Enfin, les cellules infectées par H2 ts 107 (Cf. Fig. 21d) présentaient une fluorescence répartie dans la cellule entière, identique à celle observée lors de l'infection avec le virus sauvage (Cf. Fig. 21a).

Ces expériences nous ont permis de montrer que si H2 ts 107 n'est pas complétement affecté sur le gène de la 100 K, son phénotype n'est pas non plus affecté dans les rôles connus de cette protéine. Avant d'envisager un nouveau rôle à la protéine majeure non structurale tardive, nous avons précisé la mutation de H2 ts 107 par différentes techniques génétiques.

## B- Caractérisation génétique de la mutation de H2 ts 107

### 1- Recombinaison

Nous avons coïnfecté des cellules par H2 ts 107 et H5 ts 1, pendant 96 h à 33° C. La fréquence de recombinaison des mutants a été calculée par comptage du nombre de plages virales formées lors d'un deuxième cycle infectieux (réalisé avec les lysats cellulaires récoltés à la fin du premier cycle) à 33° C d'une part et à 39° C d'autre part.

Nous avons obtenu par cette technique une fréquence de recombinaison de 3 à  $4 \cdot 10^{-3}$  entre H5 ts 1 et H2 ts 107. Ce taux est très faible, par rapport aux fréquences couramment obtenues entre des mutants affectés sur des régions éloignées l'une de l'autre (HASSEL and WEBER, 1978).

Néanmoins, le fait qu'aucune complémentation ne soit possible entre les deux mutants d'une part, et que leur fréquence de recombinaison soit très faible d'autre part, pourrait suggérer l'existence de différents domaines fonctionnels sur le gène de la 100 K, les mutations de H5 ts 1 et H2 ts 107 étant dès lors représentative de deux domaines. Un tel résultat s'accorderait avec ceux de OOSTEROM-DRAGON and GINSBERG (1981), qui obtinrent des polypeptides 100 K, hybrides entre Ad5 et Ad2, fonctionnels.

D'autres recombinants entre H2 ts 107 d'une part et H5 ts 36 (défectif dans la synthèse de l'ADN) ou H5 ts 58 (défectif dans l'expression du polypeptide IIIa) d'autre part furent réalisés dans le laboratoire.

L'ADN de ces recombinants fut analysé par digestion avec des endonucléases de restriction. Le tableau 6 résume la position des séquences spécifiques d'Ad2 et d'Ad5 dans ces recombinants.

L'analyse de ces résultats permet de déterminer la position de la mutation de H2 ts 107 entre les coordonnées 68 et 70,7 UG, soit dans une zone représentant moins de 3 % du génome (environ 1000 nucléotides).



Tableau 7 : Sauvetage de la mutation de H2 ts 107  
par des fragments de l'ADN d'Ad2 WT




---

Nature de l'ADN cotransfecté avec le complexe ADN-TP H2 <u>ts</u> 107	Localisation sur le génomme virale (en UG)	Nombre de plages/ boîte de pétri à 39.5° C
---	---	--

---

Plasmide

pVM 504	59,5-75,9	56
pVM 508	59,5-65,9+67,8-75,9	40
pVM 509	59,5-65,9+75,8-75,9	0
pVM 543	72,8-75,9	0
pVM 565	59,5-68,2+69,9-75,8	0
pVM 511	63,6-65,9+75,8-75,9	0

Fragment de restriction

Hind III B	72,8-89,1	0
Bst E IIB	67,8-98	65
pVM 508/Bgl II/Hind III	69-72,8	9
pVM 508/Bst EII, Kpn I	67,8-71,4	5

Controle simple transfection

ADN d'Ad2 WT	-	17
pVM 504	-	0
H2 ts 107	-	0
cellules non infectées	-	0

---

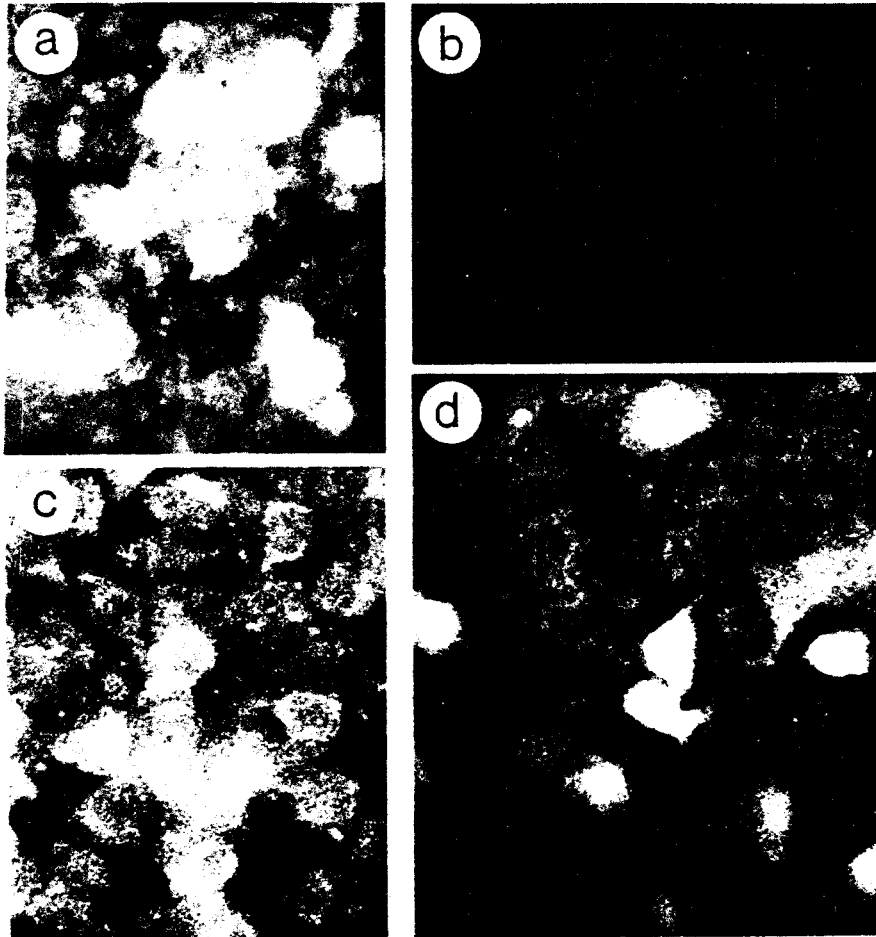


Figure 21 : Localisation des hexons capsomériques dans des cellules infectées.

- a : par Ad2 WT
- b : par H5 ts 1
- c : par H2 ts 118
- d : par H2 ts 107

## 2- Sauvetage de la mutation par des fragments d'ADN de l'adénovirus sauvage

La recombinaison du complexe ADN-TP d'H2 ts 107 co-transfecté par précipitation au phosphate de calcium avec des fragments d'ADN de différentes régions du génome du virus sauvage, permet ou non le sauvetage de la mutation. Le résultat est visualisé par la formation de plages de lyse de virus recombinants de type sauvage.

Nous avons utilisé cette méthode pour préciser la localisation de la mutation de H2 ts 107. Nous nous sommes servis soit de fragments d'adénovirus sauvage purifiés sur gel d'agarose et élués, soit de plasmides pBR 322 ayant intégrés des zones précises du génome viral sauvage. Les séquences insérées dans les différents plasmides qui ont été réalisés dans le laboratoire, ainsi que les résultats qu'ils nous ont permis d'obtenir sont détaillés dans le Tableau 7.

La localisation de la mutation de H2 ts 107 a été précisée par cette méthode entre 69 et 69,9 UG, soit sur un fragment de 300 nucléotides.

Nous avons alors séquencé cette région par la méthode de terminaison des chaînes en utilisant le phage M13 comme vecteur.

## 3- Séquençage par la méthode "des dideoxy"

Les techniques de clonage dans M13 furent développées par MESSING (1983). Nous avons utilisé cette méthode car elle nous permettait de préparer facilement de grandes quantités d'ADN simple brin.

Nous avons digéré par l'enzyme de restriction Sau 3A, le fragment purifié d'ADN d'H2 ts 107 66,5 - 70,3 UG (Sac I - Xho I). Les quatre fragments d'ADN obtenus (680, 287, 180 et 180 paires de bases) furent clonés dans les vecteurs mp18 et mp19 (EGGERDING and PIERCE, 1983).

Dans le fragment Sac I-Sau 3A de 287 paires de bases, nous avons trouvé aux deux positions 25082 et 25083 un changement de deux nucléotides. De cette modification résulte un codon GCA remplaçant le codon GAC du type sauvage. Ceci entraîne le changement de l'acide aminé acide aspartique en alanine. La mutation de H2 ts 107 se situe au niveau du 324e acide aminé à partir de l'extrémité N-ter, de la 100 K.

Cette modification n'a pu être provoquée par le traitement à l'acide nitreux qui permit d'obtenir ce mutant (MARTIN et al., 1978). Il s'agit probablement d'un mutant spontané sélectionné dans le système de clonage et l'inversion apparue des deux nucléotides représenterait deux mutations par transversion sur le même codon.

#### 4- Conclusions

Nous avons déterminé que le mutant d'assemblage H2 ts 107 est affecté sur le gène de la 100 K. Cependant, son phénotype est normal pour les rôles jusqu'alors connus de la 100 K (CEPKO and SHARP, 1982 ; OOSTEROM-DRAGON and GINSBERG, 1981 ; GAMBKE and DEPPERT, 1981a,b ; GAMBKE and DEPPERT, 1983).

Le cycle de H2 ts 107 se déroule à 39.5° C jusqu'à un stade plus tardif que les autres mutants sur le même gène. Le blocage de son information se réalise au niveau de l'assemblage de prestructure. Ceci implique un rôle probable de la 100 K à ce niveau. Ce rôle était déjà soupçonné, car la 100 K est retrouvée associée aux jeunes virions (EDVARDSSON et al., 1976).

Nous avons remarqué que les particules immatures de H2 ts 107 possèdent une protéine de 90 K qui n'existe pas dans les IM d'adénovirus sauvage isolés dans les mêmes conditions. Or, CEPKO et al. (1981) coprécipitaient avec un sérum monoclonal anti-hexon de l'hexon et un doublet 100 K - 95 K. Nous avons voulu déterminer si la 90 K des IM de H2 ts 107 était apparentée à la 100 K codée par la région L4 du génome viral.

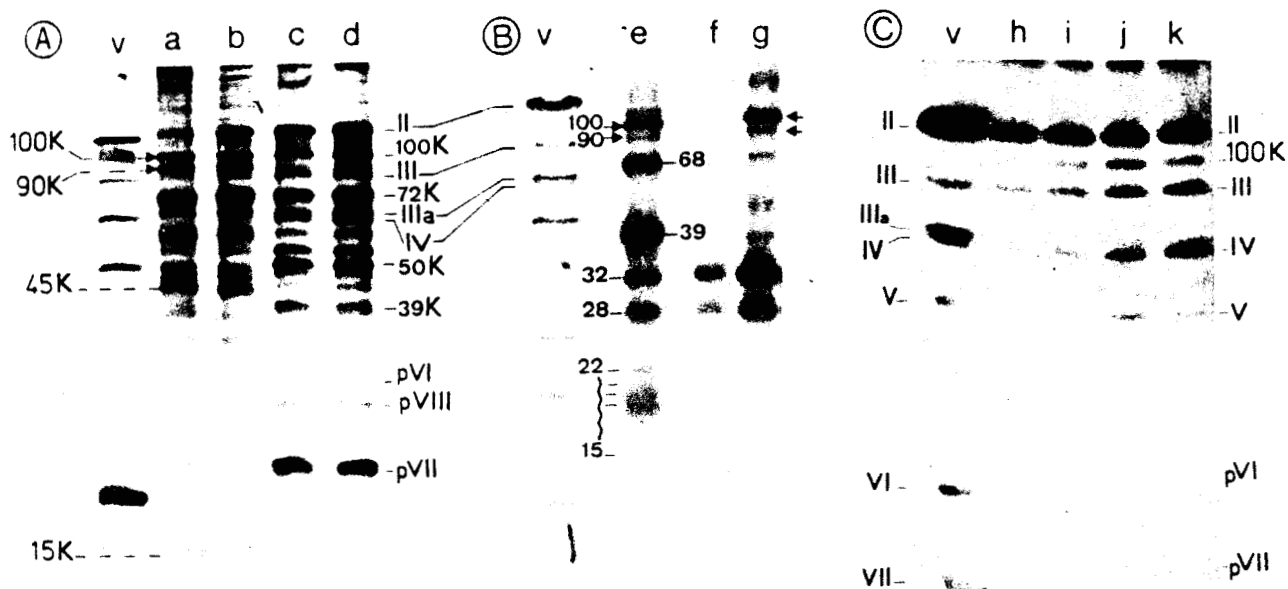
#### C- Communautés entre la 100 K et la 90 K

##### 1- Communautés structurales

AXELROD (1978) montra que la 100 K est phosphorylée. Nous avons marqué à  $^{32}\text{P}-\text{H}_3\text{PO}_4$  une culture cellulaire infectée par H2 ts 107. Les particules IM purifiées et analysées en gel de polyacrylamide SDS, puis autoradiographiées (Cf. Fig. 22B, ligne e) possèdent un doublet 100 K - 90 K marqué au  $^{32}\text{P}$ .

Nous avons précipité ces intermédiaires après leur rupture au déoxycholate de sodium par un sérum non immun (Cf. Fig. 22B, ligne f) et par un sérum polyclonal anti-100 K (Cf. Fig. 22B, ligne g), que le professeur DEPPERT nous avait gentiment donné. On observe sur cette figure que le sérum anti-100 K permet la précipitation d'un doublet 100 K - 90 K. Ceci suggère soit que la 100 K et la 90 K restent associées par voisinage après la désintégration au DOC, soit qu'il existe des parentés antigéniques et conformationnelles entre ces deux protéines. Deux autres peptides de 28 et 32 K sont précipités à la fois par les séra anti-100 K et par le sérum non immun. Ils ne sont probablement pas apparentés à la 100 K.

Il est possible de déterminer par incorporation de  $^{14}\text{C}$ -acétate si une protéine est N-acétylée (BOUDIN et al., 1983). Nous avons infecté une culture



**Figure 22 :** Analyse des protéines des IM d'H2 ts 107 après phosphorylation ou N-acétylation.

- B. V : virus Ad2 WT marqueur ( $^{14}\text{C}$ -formiate)  
 e : IM d'H2 ts 107 purifiés après marquage au  $^{32}\text{P}$ - $\text{H}_3\text{PO}_4$   
 f : IM d'H2 ts 107 de (e) après précipitation par un sérum non immun  
 g : IM d'H2 ts 107 de (e) après précipitation par un sérum polyclonal anti 100 K
- C. V : virus Ad2 WT marqueur ( $^{14}\text{C}$ -formiate)  
 h, i, j, k : IM d'H2 ts 107 après N-acétylation au  $^{14}\text{C}$ -acétate. Après 16 h de marquage à  $39.5^\circ$  (h), 2 heures de chasse à  $33^\circ$  C (i), 4 h de chasse à  $33^\circ$  C (j), 6 h de chasse à  $33^\circ$  C (k).

de cellules par H2 ts 107 pendant 16 heures à 39.5° C dans un milieu contenant du <sup>14</sup>C-acétate. Nous avons ensuite chassé cette culture à 33° C pendant 0, 2, 4 et 6 heures. Les intermédiaires d'assemblage furent purifiés, et les polypeptides viraux soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide et autoradiographiés. Le profil de la Fig. 22C montre l'évolution de l'incorporation du <sup>14</sup>C-acétate au cours de la chasse. On observe que la radioactivité dans la 100 K N-acétylée augmente au cours de la chasse ; mais aucune bande de 90 K n'apparaît sur l'autoradiographie. Le polypeptide 90 K ne possède pas son extrémité N-acétylée.

Par la méthode de CLEVELAND et al. (1977), nous avons cherché à déterminer si 100 K et 90 K possédaient des peptides communs. Après séparation en gel de polyacrylamide-SDS, les bandes correspondantes aux protéines 100 K et 90 K sont excisées puis digérées par la protéase V8 de Staphylococcus aureus à différentes concentrations. Le profil de migration des peptides marqués à la <sup>35</sup>S- méthionine (Cf. Fig. 23A) est identique pour la majorité des espèces. Néanmoins, la sensibilité de la 90 K à la protéase est beaucoup plus grande.

Le diagramme des peptides phosphorylés (Cf. Fig. 23B) révèle à la fois pour la 100 K et la 90 K, une espèce majeure de 45 K. Toutefois, on observe des variations entre certains peptides de faible masse moléculaire.

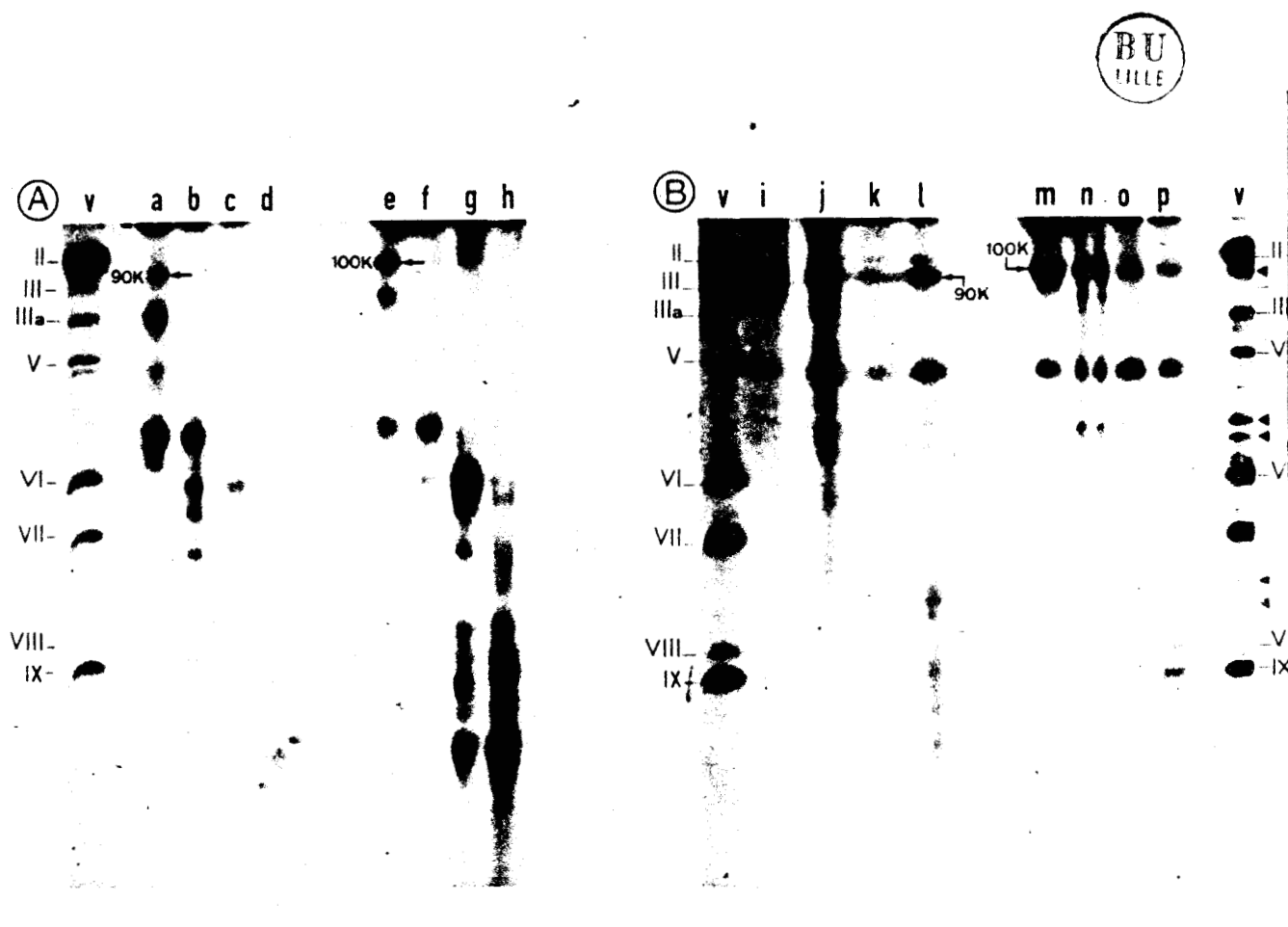
Ces résultats confirment la parenté structurale existante entre la 100 K et la 90 K. Le fait que la 90 K ne soit pas N-acétylée suggère fortement qu'elle résulte du clivage de la partie N-ter de la 100 K. Néanmoins, nous avons vérifié que la mutation de H2 ts 107 ne crée pas de site de clivage protéolytique du type Gly-Ala reconnaissable par une enzyme "trypsine like" comme la protéase virale. En effet, le changement que nous avons observé chez H2 ts 107 transforme une séquence Ala-Asp en Ala-Ala.

Il est possible que le clivage de la 100 K à son extrémité N-ter soit un événement se produisant également chez le virus sauvage, dans certaines conditions. La 90 K, éliminée dans le virus sauvage, subsisterait dans les particules du mutant.

## 2- Communautés immunologiques

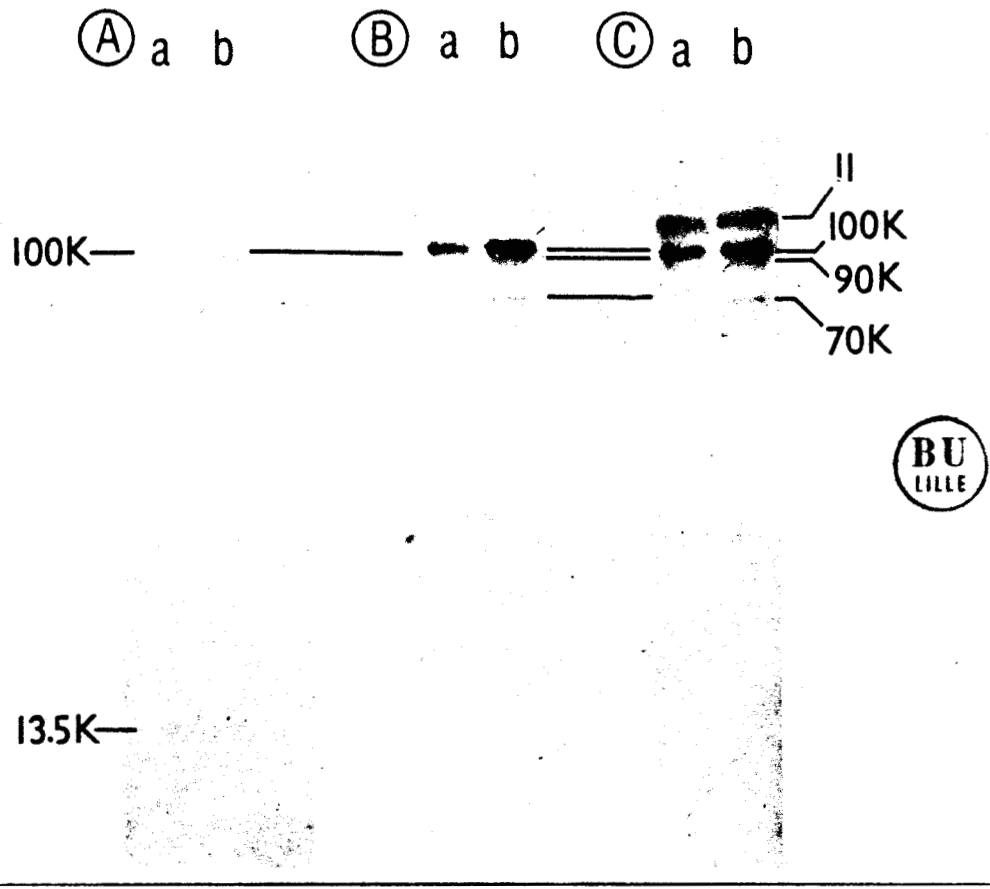
Plusieurs lapins ont été immunisés avec les polypeptides 100 K ou le 90 K. Les sérums obtenus furent appelés anti 100 K N, anti 100 K W et anti 90 K.

Après dissociation au déoxycholate de sodium, les intermédiaires de maturation de H2 ts 107, d'adénovirus sauvage, et les protéines virales sont séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS, puis transférés



**Figure 23 :** Migration en gel d'acrylamide des peptides de la 90 K et de la 100 K obtenus après leur digestion à la protéase V8 de *Staphylococcus aureus*.

- A. marquage à la  $^{35}\text{S}$ -méthionine  
 ligne V : virus marqueur Ad2 WT ( $^{14}\text{C}$ -formiate)  
 lignes a, b, c, d : digestion de la 90 K par des concentrations croissantes de la protéase V8  
 lignes e, f, g, h : digestion de la 100 K par des concentrations croissantes de la protéase V8
- B. marquage au  $^{32}\text{P}$  -  $\text{H}_3\text{PO}_4$   
 ligne V : virus marqueur  $^{14}\text{C}$ -formiate  
 i, j, k, l : digestion de la 90 K par des concentrations croissantes de la protéase V8  
 m, n, o, p : digestion de la 100 K par des concentrations croissantes de la protéase V8



**Figure 24 :** Précipitation après dissociation au déoxycholate de sodium des IM d'H2 ts 107 et d'Ad2 WT par différents séra.

- ligne a : Ad2 WT
- ligne b : H2 ts 107
- A : sérum anti 100 K N
- B : sérum anti 90 K
- C : sérum anti 100 K W



électriquement sur une membrane de nitrate de cellulose ; enfin, ils sont analysés avec nos différents sera (Cf. Fig. 24A, B, C). Nous avons révélé les immunoprécipités par la protéine A de Staphylococcus aureus marquée à l'<sup>125</sup>I.

Notre sérum anti 100 K W révèle le doublet 100 - 90 K ainsi que l'hexon (Cf. Fig. 24C : ligne a, Ad<sub>2</sub> WT ; ligne b, H2 ts 107).

Le profil est comparable à celui que nous avons obtenu avec le sérum anti-100 K du Pr. DEPERT. Cependant, une bande de 70 K dans les IM de H2 ts 107 est également révélée et correspond probablement à un produit de clivage. Notre sérum anti-90 K nous a apporté le même résultat, néanmoins, l'hexon y est beaucoup moins visible (Cf. Fig. 24B a, b).

Par contre le sérum appelé anti 100 K N (Cf. Fig. 24A a, b) ne révèle pas la 90 K mais une faible bande de 13,5 K coprécipitée avec la 100 K à la fois dans les IM de H2 ts 107 (b) et dans les virus de Ad<sub>2</sub> WT (a). Par ailleurs, un extrait de cellules infectées par H2 ts 107, marquées au <sup>14</sup>C-acétate, traité comme précédemment, puis incubé avec le sérum anti-100 K N et révélé à la peroxydase indique la même bande de 13,5 K à la fois en coloration et en autoradiographie. Le sérum anti 100 K N révèle spécifiquement la partie N-acétylée de la 100 K, clivée dans la 90 K.

Le fait que le polypeptide 13,5 K soit à la fois retrouvé chez l'Ad<sub>2</sub> WT et H2 ts 107 indique que le clivage est également réalisé chez le virus sauvage.

#### D- Importance de la 100 K et de la 90 K dans l'échafaudage des particules

##### 1- Affinité de la 100 K pour les trimères d'hexons

L'expression de H2 ts 107 à 39.5°C est bloquée lors de l'échafaudage des capsides. Ceci implique un rôle de la 100 K dans ce mécanisme. Elle possède donc vraisemblablement un site d'affinité ou de liaison pour l'hexon trimérique.

Pour mettre en évidence cette affinité, nous avons utilisé des colonnes d'affinité hexon-sépharose. Les capsomères d'hexons purifiés (BOULANGER and PUVION, 1974) ont été liés au sépharose préalablement activé au bromure de cyanogène.

Une colonne "témoin" consistait en la dénaturation dans le SDS à 100° C pendant 5 mn d'hexon sépharose. Nous avons vérifié "l'état" des hexons capsomériques dans les deux colonnes (matures et dénaturés) en chromatographiant un antisérum anti-hexon capsomérique de lapin. Le profil

d'élution obtenu en fonction de la concentration en sels, indique que la colonne hexon natif - sépharose est capable de retenir à 100 % les anticorps spécifiques des trimères. Sur la colonne hexon sépharose dénaturé au SDS, 72 % des anticorps sont exclus, la dénaturation des antigènes n'a donc pas été totale.

Nous avons préparé pour les deux chromatographies des antigènes solubles marqués à la  $^{35}\text{S}$ -Met, à partir de cellules infectées à  $39.5^\circ\text{C}$  par le mutant hexon(-) H2 ts 121. Ce mutant a été choisi pour éviter des interactions possibles entre la 100 K et des hexons solubles. La figure 25 montre les profils d'élution obtenus : en A avec la colonne native et en B avec la colonne dénaturée. Dans la colonne dénaturée au SDS, toute la 100 K est éluee dans le pic exclu. Alors que dans la colonne native, la protéine non structurale 100 K n'est éluee de la colonne qu'à haute force ionique (0,8 M KCl + 5 M urée) (Cf. Fig. 25A, d).

La fixation très forte de la 100 K sur les hexons capsomériques de la colonne native implique l'existence d'un site de liaison entre ces protéines et par conséquent un rôle direct de la protéine tardive non structurale majeure dans l'assemblage des hexons trimériques en capsides.

Nous avons voulu déterminer la localisation respective des polypeptides 100 K et 90 K au sein des IM de H2 ts 107.

## 2- Topographie de la 90 K et de la 100 K dans les IM d'H2 ts 107

La rupture de particules vides au DOC à  $56^\circ\text{C}$  (BOULANGER et al., 1979), aboutit aux structures : groupes de 9 hexons et protéines de l'apex, séparables en gradient de glycérol.

Nous avons analysé ces fractions dans les IM de H2 ts 107 ayant incorporé du  $^{32}\text{P}$ - $\text{H}_3\text{PO}_4$ . L'autoradiogramme indique que la 90 K est associée aux groupes de 9 hexons, alors que la 100 K se situe au niveau des zones apicales.

Parallèlement, la précipitation par des immunséras (anti-hexon, anti base, anti-IIIa et anti-IX) de particules  $^{32}\text{P}$ -IM de H2 ts 107 traitées au DOC (Cf. Fig. 26) révèle en (a) avec le sérum non immun un doublet 28-32 K, en (b) et (c) avec respectivement les séras anti-hexon et anti-IX une coprécipitation hexon-90 K et IX-90 K ;

Enfin, en (c) et (d) avec respectivement les séras anti-base du penton et anti-IIIa une coprécipitation du penton base-100 K et IIIa-100 K.

La 90 K est associée aux protéines II et IX représentatives des groupes de 9 hexons, alors que la 100 K coprécipite avec le IIIa ou la base du penton et semble donc être localisée au niveau des zones apicales.

Cette association va dans le sens de l'hypothèse d'un échafaudage des

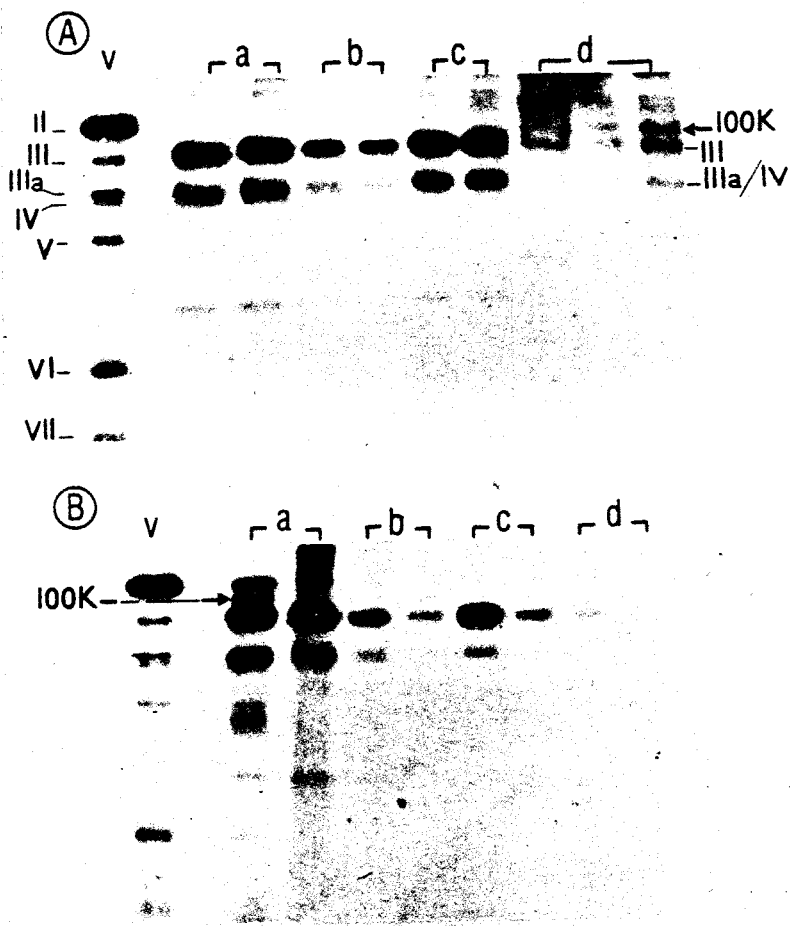


Figure 25 : Affinité de la 100 K pour des colonnes d'hexon sépharose

A : colonne d'hexon sépharose natif

B : colonne d'hexon sépharose dénaturé au SDS

ligne a : pic exclu

ligne b : élution 0,2 M KCl

ligne c : élution 0,8 M KCl

ligne d : élution 0,8 M KCl + 5 M urée

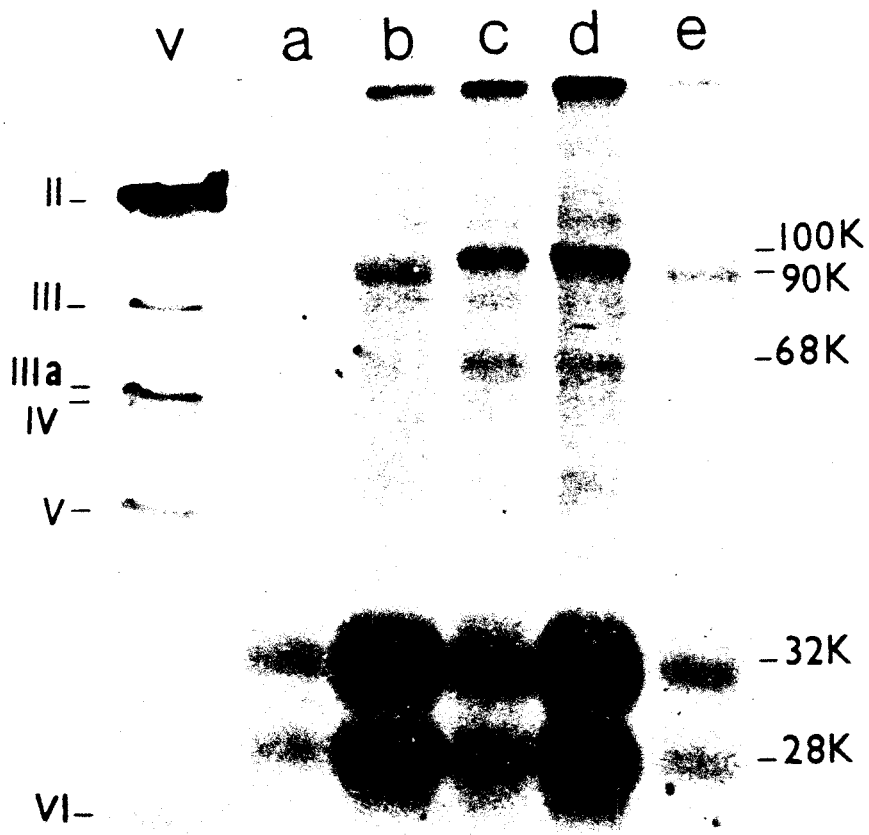


Figure 26 : Précipitation des protéines phosphorylées des IM de l'H2 ts 107 après dissociation au déoxycholate de sodium par différents séra

- V : virus Ad2 WT (<sup>14</sup>C formiate) marqueur
- a : précipitation avec un sérum non immun
- b : précipitation avec un sérum anti hexon
- c : précipitation avec un sérum anti base
- d : précipitation avec un sérum anti IIIa
- e : précipitation avec un sérum anti IX

**Tableau 8 :** Analyse des autoradiographies des fractions d'Ad2 WT chromatographiées sur colonne de novobiocine sépharose



Fractions	% d'incorporation dans le polypeptide					rapport 100K/II
	II	100 K	III	72-75 K	66-12 K	
<u>1<sup>er</sup> cycle</u> (c)						
pic exclu	10,4	5,3	8,1	7,2	68,9	0,51
élution novobiocine	23,2	20	13,2	5,1	38,5	0,86
élution ATP+Mg <sup>++</sup>	28	34,9	10,5	4,7	21,8	1,24
élution 0,8 M KCl	6,8	18,2	7,0	17,4	57,4	2,67
élution NaCl-Urée	8,8	23,8	3,5	14,9	48,9	2,70
<u>2<sup>ème</sup> cycle</u> (c)						
pic exclu	28,7	11,3	14,7	ND <sup>(d)</sup>	45,2	0,39
élution novobiocine	11,2	23	18,7	ND	46,3	1,92
élution ATP+Mg <sup>++</sup>	12	20,5	13,2	ND	54,1	1,71

a : Le doublet 72-75 K correspond à la forme phosphorylée et non phosphorylée de la 72 K DBP

b : Les chiffres correspondent à l'ensemble des bandes ayant migré lors de l'électrophorèse entre le IIIa (66 K) et le IX (12 K).

c : les fractions éluées avec le tampon novobiocine et ATP-Mg<sup>++</sup> ont été réunies, dialysées et rechromatographiées sur la même colonne novobiocine sépharose.

d : non détectable

capsides à partir d'une copolymérisation 100 K, hexon, penton, suivie de la maturation par clivage de la 100 K en 90 K et 13 K. L'existence d'une 90 K, liée aux groupes de 9 hexons suggère que ces groupes de 9 hexons, c'est-à-dire les faces de l'icosaèdre, sont constitués de matériel plus ancien que les apex où se trouve la 100 K non clivée. Cela confirme les résultats de cinétique de marquage des particules virales précédemment montrés.

#### E- Intervention de la 100 K dans l'encapsidation de l'ADN

La novobiocine (inhibiteur des gyrases et topoisomérases) inhibe l'initiation de la réplication de l'ADN viral et son encapsidation (D'HALLUIN et al., 1980).

Nous voulions identifier les protéines virales impliquées dans cette étape de l'assemblage grâce à l'action de la novobiocine. Nous avons chromatographié trois types d'extraits marqués à la  $^{35}\text{S}$ -méthionine sur des colonnes novobiocine-sépharose, pour essayer d'identifier des produits viraux ayant une affinité pour la novobiocine.

Notre témoin était un extrait cellulaire non infecté (Cf. Fig. 27A). 98 % du matériel injecté sur la colonne (ligne a) a été retrouvé dans le pic exclu (ligne b). Néanmoins, des traces d'actine (42 K) ont été éluées en haute force ionique et en urée 5 M (lignes e, f). Cette élution en haute force ionique résulte davantage d'une adsorption non spécifique sur la colonne.

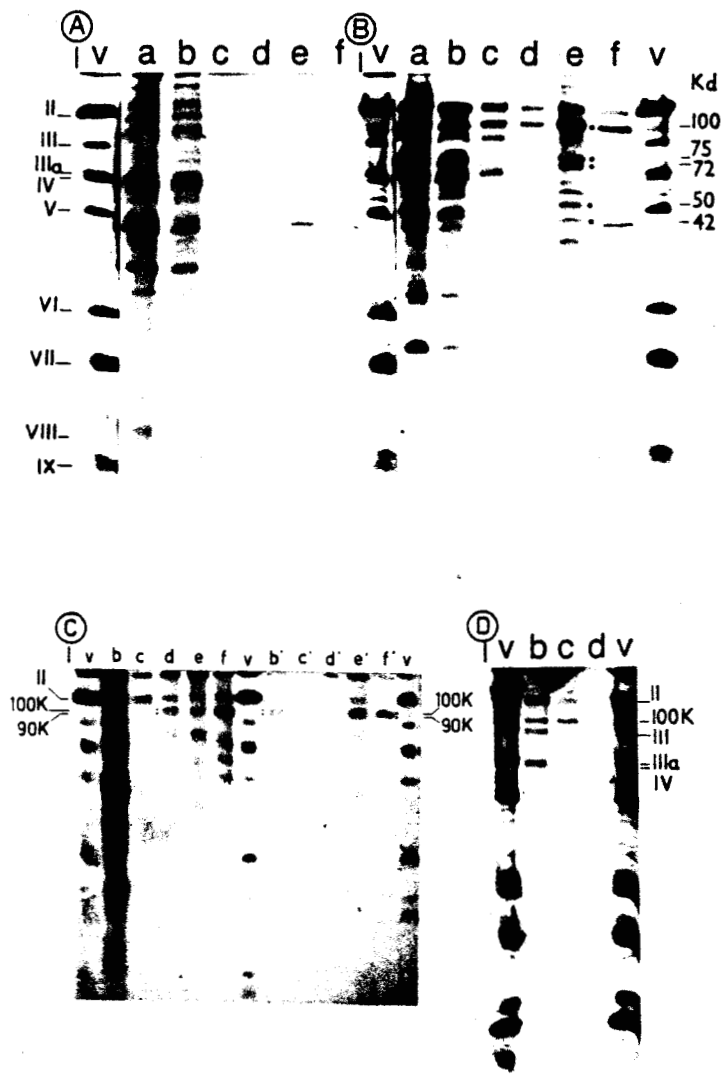
Le lysat de cellules infectées par Ad2 WT (Fig. 27B) présente un profil plus complexe. Une grande partie du matériel est à nouveau éliminée dans le pic exclu (ligne b) ; cependant, plusieurs espèces sont maintenant éluées : en (c) avec de la novobiocine, et en (d) avec de l'ATP et du magnésium.

Ces espèces éluées sont déplacées beaucoup plus spécifiquement et réellement attachées à la colonne par affinité par rapport aux éluats obtenus à haute force ionique (KCl 0,8 M) (e) et en urée 5 M (f).

Dans ces fractions ayant une affinité supérieure, on retrouve les polypeptides II, III, IIIa, IV, 100 K et des traces de 72 K.

L'analyse de l'autoradiogramme a permis de déterminer le pourcentage des différents polypeptides dans les différentes fractions (Cf. Tableau 8). Les fractions peptidiques obtenues en c et d ont été mélangées et rechromatographiées sur la même colonne (Cf. Fig. 27D). On observe que lors de cette deuxième élution, la majorité des protéines capsomériques III, IIIa, IV et une grande quantité d'hexons sont alors retrouvées dans le pic exclu (b).

Par contre l'élution spécifique par la novobiocine permet celle (c) de la 100 K et de l'hexon. Par rapport au premier cycle de chromatographie,



**Figure 27 :** Chromatographie d'extraits de cellules infectées ou non sur colonne de novobiocine-sépharose

- A : cellules non infectées
- B : cellules infectées par H2 Ad2 WT
- C : cellules infectées par H2 ts 107
- D : deuxième chromatographie des fractions éluées en B (c,d)

- a : fraction injectée
- b : pic exclu
- c : élution par la novobiocine
- d : élution par ATP + Mg<sup>++</sup>
- e : élution par 0,8 M KCl
- f : élution par 0,8 M KCl + 5 M urée

(b', c', d', e', f'') correspondent à C (b, c, d, e, f) après précipitation par un sérum anti 90 K

l'enrichissement, dans cette fraction éluée par la novobiocine, en polypeptide 100 K par rapport à l'hexon passe de 0,86 à 1,92 (Cf. Tableau 8). Dans ce cycle, aucune autre protéine n'a été éluée à haute force ionique.

H2 ts 107 étant muté dans le gène de la 100 K, nous avons voulu connaître le comportement du couple 90 K-100 K. Nous avons alors réalisé la même chromatographie en injectant un extrait de cellules infectées à 39.5° C par H2 ts 107.

Sur l'autoradiographie (Cf. Fig. 27 C), on constate qu'il n'existe pas de variation de comportement entre 100 K et 90 K. Ces deux polypeptides sont toujours coélusés.

Cependant si l'on compare le profil d'éluion obtenu avec H2 ts 107 et Ad2 WT, on constate que le doublet 100 K - 90 K n'est pas élué en présence de novobiocine (c) seule, mais nécessite ATP et magnésium (d).

Ces résultats suggèrent une affinité indéniable de la 100 K pour la novobiocine différente dans les mutants et le sauvage. Néanmoins, le mode d'interaction et la signification de cette affinité restent à étudier. La 100 K agit-elle directement sur la novobiocine ou par l'intermédiaire d'une protéine cellulaire ?

L'affinité différente du doublet 100 K - 90 K de H2 ts 107 suggère une altération globale de la structure de ces polypeptides.

Cependant la coélution 100 K - 90 K implique que le domaine N-terminal n'est pas nécessaire à la liaison à la novobiocine.



DISCUSSION - CONCLUSION

Cette étude sur l'assemblage de l'adénovirus nous a permis de mettre en évidence une séquence d'entrée des protéines dans les particules virales. Nous avons pu préciser les fonctions de deux classes de protéines non structurales en fonction de leur cinétique d'incorporation. Par ailleurs, la protéine non structurale, 100 K, s'est révélée être une protéine plurifonctionnelle dans laquelle quatre domaines peuvent être définis.

Lors de la phase tardive du cycle lytique, les protéines traduites dans le cytoplasme migrent vers le noyau où se déroule le processus d'assemblage des capsides qui aboutira à la propagation du virus.

L'analyse des sous-structures virales (apex, groupe de 9 hexons et nucléoïde), lors de nos expériences de double marquage sur le virus sauvage en présence de cycloheximide, révèle l'arrivée, récente, de matériel marqué récent au niveau des structures apicales. Ce résultat est particulièrement visible sur la courbe c de la figure 14 où les IM sont assemblés, après la levée du bloc cycloheximide, avec du matériel neuf marqué à la  $^3\text{H}$ -valine.

Grâce à l'étude des polypeptides radioactifs après les doubles marquages du virus sauvage, ainsi qu'aux résultats obtenus avec H2 ts 112 lors de la double synchronisation de son expression, nous avons pu faire une discrimination entre les différents polypeptides d'une même sous-structure (apex, groupe de 9, nucléoïde), ce qui nous a permis d'établir leur cinétique d'entrée dans la capside.

Les pics de marquage ( $^3\text{H}$ -Val) récent et, par conséquent, incorporé tardivement dans les IM (Fig. 16e), se retrouvent dans les polypeptides IIIa<sub>2</sub>-IV et pVI-pVIII.

L'autoradiographie des IM de H2 ts 112 (Fig. 17, p) a confirmé et affiné ce résultat. En effet, les bandes majeures révélées étaient IIIa, 50 K et pVI. Enfin, les cinétiques de marquage des IM d'H2 ts 107 mettent en évidence que la population de densité 1,285 est antérieure dans le déroulement du cycle viral à la population de d : 1,295 vers laquelle elle évolue (Cf. Tableau 4) ; or la figure 19 indique une nette augmentation de l'incorporation dans les polypeptides IIIa, 50 K, pVI et 28 K de la population 1,295 par rapport à celle de 1,285.

Au niveau des faces des IM, le seul polypeptide incorporé tardivement dans les particules (marqué à la  $^3\text{H}$ -Val) est le polypeptide IX (Cf. Fig. 16).

Par l'analyse des populations virales (Fig. 15 g, h, i), nous avons vérifié qu'aucune protéine nouvelle n'est incorporée lors du passage "IM ancien" à "virion mature", exception faite du couple 50 K-V-pVII. Le pVII étant déjà associé très précocement aux IM, le pic de pVII incorporé tardivement correspond soit à un échange avec le pVII déjà présent dans les particules, soit à une nouvelle incorporation.

L'ensemble de ces résultats permet de proposer le schéma suivant :

- la capsid se formerait par association des protéines capsomériques de structure II, III, IV ;

- les polypeptides 100 K, 33-39 K, pVII et pVIII s'y associeraient très précocement.

- une deuxième classe de protéines, IIIa, 50 K, pVI et IX serait incorporée plus tardivement.

Nous pourrions définir la 1ère classe de polypeptides incorporés comme polypeptides d'échafaudage. Ces protéines (33-39 K, 100 K, pVII et pVIII) permettraient l'échafaudage et la formation de la structure capsidique ; Elles possèdent la propriété commune d'être soit totalement éliminées, soit modifiées lors de la maturation des particules.

Les protéines arrivant plus tardivement seraient les protéines de stabilisation - modification. Ainsi, le polypeptide IX, par son association aux groupes de 9 hexons (van OOSTRUM and BURNETT, 1985), et vraisemblablement le IIIa, par son association aux zones apicales, permettraient la stabilisation de la capsid. Le polypeptide 50 K a jusqu'alors été considéré comme protéine d'échafaudage (EDVARDSON et al., 1976 ; D'HALLUIN et al., 1978 a,b) du fait de sa disparition lors de la maturation du virus. Néanmoins, il s'est davantage révélé dans l'ensemble de nos expériences (Cf. Fig. 17, 18, 19) comme une protéine de "stabilisation" pénétrant tardivement dans la capsid. Lors de l'étude des IM et des virons de H2 ts 112 (Cf. Fig. 17, 18), nous avons trouvé une quantité importante de 50 K associée aux jeunes virions. Cependant, il n'existe aucune identité 50 K - V, bien que les deux protéines soient phosphorylées, leurs profils tryptiques sont totalement différents (WEBER and KHITTOO, 1983), il n'est donc pas envisageable de considérer la 50 K comme un précurseur du V. De plus, la 50 K possède un rôle de protéine de stabilisation avec son arrivée tardive, mais se comporte comme une protéine d'échafaudage en se dissociant de la particule mature. Elle possède donc un rôle ambigu. Il est possible qu'elle soit interchangée avec le polypeptide V lors de son incorporation dans la capsid.

L'étude du mutant H2 ts 107 nous a permis d'étudier la protéine d'échafaudage 100 K et d'observer son implication dans différentes étapes de la morphogénèse.

Les monomères natifs des hexons se lient dans le cytoplasme à la protéine 100 K, pour y former des complexes de masse moléculaire 800 K (CEPKO and SHARP, 1983). Cette association entre hexon et 100 K pourrait impliquer un phénomène de coopérativité, comme c'est le cas entre gp8 et gp5 du phage P22

(FULLER and KING, 1982), permettant l'attachement successif des différents monomères au fur et à mesure des changements conformationnels.

Pour CEPKO et SHARP (1983), l'apparition des trimères d'hexons coïncide au relargage des polypeptides 100 K.

Cependant GAMBKE et DEPERT (1981a) trouvent que la 100 K est impliquée dans le transport des capsomères majeurs de la capside. Nous avons confirmé ce deuxième rôle de la 100 K, avec l'H2 ts 118 qui accumule des trimères d'hexon dans la région périnucléaire (Cf. Fig. 20). C'est donc le domaine C-terminal où la mutation de l'H2 ts 118 a été localisée, qui participe à la réaction de transport. D'autre part, nous avons montré que H2 ts 107 est muté au niveau du 324<sup>e</sup> AA de la protéine non structurale 100 K. Or les capacités à trimériser et à transporter l'hexon ne sont pas affectées chez ce mutant. Le phénotype d'H2 ts 107 est "assemblage négatif" (il ne réalise aucun assemblage à température restrictive) ; nous savons également que la 100 K s'associe précocement aux capsomères ; De plus la 100 K a une grande affinité pour l'hexon trimérique (Cf. Fig. 25) ; Enfin, chez H2 ts 107, elle se clive rapidement en 90 K et 13 K.

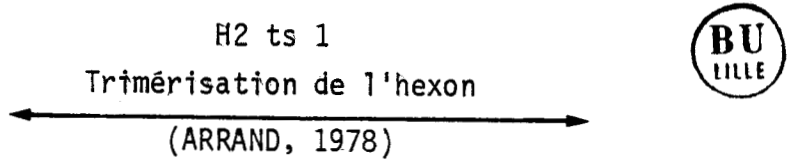
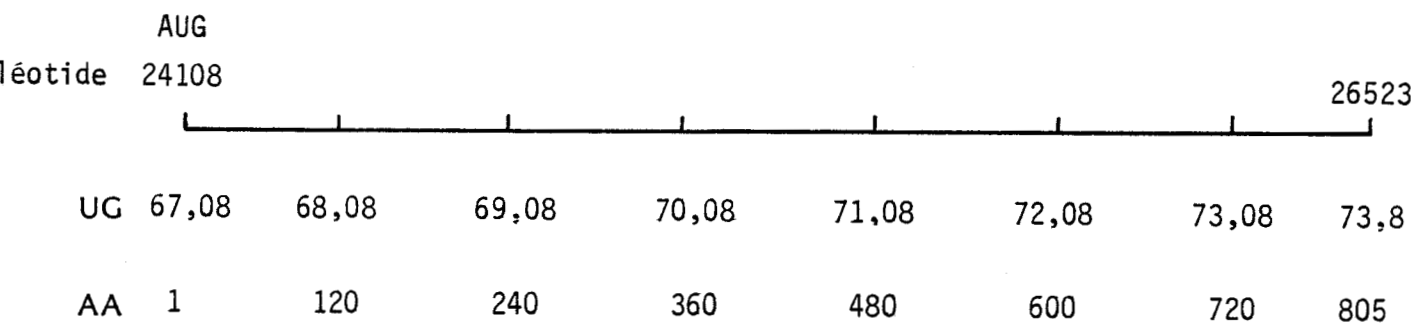
Nous en avons déduit un troisième rôle de la 100 K dans l'échafaudage des capsides et leur assemblage.

En abordant le problème de la pénétration de l'ADN viral dans la capside, nous avons montré une forte affinité de la 100 K pour les colonnes de novobiocine sépharose (Cf. Fig. 17b) (la novobiocine inhibe l'encapsidation de l'ADN de l'adénovirus : D'HALLUIN et al., 1980. Nous avons pu en conclure son implication directe, ou plus probablement indirecte par l'intermédiaire d'une protéine cellulaire au niveau de l'encapsidation de l'ADN viral. Chez le mutant H2 ts 107, nous n'avons pu constater aucune différence d'élution entre les protéines 100 K et 90 K sur colonne de novobiocine sépharose. L'extrémité N-terminale de la 100 K n'est donc pas la cible de cette affinité.

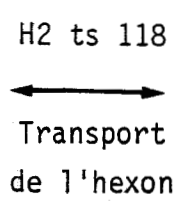
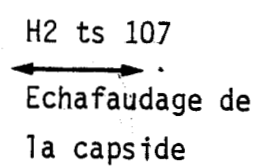
Nous savons que la 100 K, protéine d'échafaudage, "disparaît" des particules au moment de l'encapsidation de l'ADN. Il est possible que les deux phénomènes soient indépendants. Mais l'implication, même lointaine de la 100 K dans l'encapsidation, la rapproche de la protéine gp8 du phage P22. En effet, chez P22, le départ de gp8 entre les interstices des protéines de capsidation gp5 vers le milieu extérieur est couplé à l'entrée de l'ADN (GRIFFIN-SHEA, 1977).

Quatre domaines fonctionnels peuvent donc être distingués sur la séquence de la 100 K comme résumé sur le schéma ci-dessous. Nous en avons localisé deux d'entre eux (transport et échafaudage). La fonction de trimérisation se situe au centre de la zone codante de la 100 K mais n'a été localisée que sur 3 UG (ARRAND, 1978). La dernière fonction, impliquant la 100 K dans le mécanisme d'encapsidation de l'ADN, reste à déterminer précisément.

Zone codante de la 100K



Rôle dans l'encapsidation  
de l'ADN ?



Les différents domaines fonctionnels du polypeptide 100 K

## C O N C L U S I O N

L'étude d'une part des particules virales obtenues lors de marquage et de blocage à la cycloheximide, et d'autre part des différents domaines fonctionnels de la 100 K (à travers la caractérisation des mutants H2 ts 107 et H2 ts 118), nous a permis de proposer le modèle d'assemblage des particules exposé dans la discussion. Nous y avons fait intervenir :

- . la cinétique d'entrée des protéines tardives que nous avons déterminée lors de l'échafaudage et de la stabilisation des particules

- . le rôle que nous avons confirmé de la 100 K dans le transport des hexons du cytoplasme au noyau

- . la nouvelle fonction dans l'échafaudage des particules que nous avons définie pour la 100 K

- . enfin, le rôle possible de la 100 K dans l'encapsidation du DNA

L'assemblage "in vitro" fait intervenir un grand nombre de paramètres encore mal définis. C'est pourquoi l'analyse détaillée des différents domaines de la 100 K par l'obtention de mutations ponctuelles dans ces domaines semble une voie dans l'étude de l'assemblage.

B I B L I O G R A P H I E

BIBLIOGRAPHIE

AKUSJARVI, G., ZABIELSKI, J., PERRICAUDET, M., and PETTERSSON, U. (1981).

The sequence of the 3' non-coding region of the hexon mRNA discloses a novel adenovirus gene.

Nucl. Acids. Res., 9, 1.

AKUSJARVI, G., and PERSSON, H. (1981).

Gene and mRNA for precursor polypeptide VI from adenovirus type 2.

J. Virol., 38, 469.

ALESTROM, P., AKUSJARVI, G., PERRICAUDET, M., MATHEWS, M.B., KLESSIG, D.F., and PETTERSSON, U. (1980).

The gene for polypeptide IX of adenovirus type 2 and its unspliced messenger RNA.

Cell, 19, 671.

ANDERSON, C.W., BAUM, P.R., and GESTELAND, R.F. (1973).

Processing of adenovirus 2-induced proteins.

J. Virol., 12, 241.

ARRAND, J.E. (1978).

Mapping of adenovirus type 5 temperature sensitive mutations by marker rescue in enhanced double DNA infections.

J. Gen. Virol., 41, 573.

ARRAND, J.R., and ROBERTS, R.J. (1979).

The nucleotide sequences at the termini of adenovirus 2 DNA.

J. Mol. Biol., 128, 577.

AXELROD, N. (1978).

Phosphoproteins of Adenovirus 2.

Virology, 87, 366.

BABICH, A., and NEVINS, J.R. (1981).

The stability of early adenovirus mRNA is controlled by the viral 72 Kd DNA binding protein.

Cell, 26, 371.



BAKER, C.C., HERISSE, J., COURTOIS, G., GALIBERT, F., and ZIFF, E. (1979).

Messenger RNA for the Ad2 DNA binding protein : DNA sequences encoding the first leader and heterogeneity at the mRNA 5' end.

Cell, 18, 569.

BAKER, C.C., and ZIFF, E.B. (1981).

Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2.

J. Mol. Biol., 149, 189.

BELIN, M.T., and BOULANGER, P. (1985).

Cytoskeletal proteins associated with intracytoplasmic human adenovirus at an early stage of infection.

Exp. Cell. Res., 160, 356.

BERGER, J., BURNETT, R.M., FRANKLIN, R.M., and GRUTTER, M. (1978).

Small angle X-ray scattering studies on adenovirus type 2 hexon.

Biochem. Biophys. Acta, 535, 233.

BERGET, S.M., MOORE, C., and SHARP, P.A., (1977).

Spliced segments of the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3171.

BERGET, S.M., and SHARP, P.A. (1979).

Structure of late adenovirus 2 heterogeneous nuclear RNA.

J. Mol. Biol., 129, 547.

BERK, A.J., and SHARP, P.A. (1978).

Structure of the adenovirus 2 early mRNAs.

Cell, 14, 695.

BERK, A.J., LEE, F., HARRISSON, T., WILLIAMS, J., and SHARP, P.A. (1979).

Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs.

Cell, 17, 935.

BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., BOS, J.L., and Van der EB, A.J. (1983).  
Role of adenovirus type 5 and 12 early region 1B tumor antigens in oncogenic  
transformation.

Virology, 126, 45.

BLAIR, G.E., and RUSSELL, W.C. (1978).

Identification of a protein kinase activity associated with human adenoviruses.

Virology, 86, 157.

BOS, J.L., POLDER, L.J., BERNARDS, R., SCHRIER, P.I., Van den ELSEN,  
P.J., Van der EB, A.J., and Van ORMONDT, H. (1981).

The 2,2 Kb E1b mRNA of human Ad12 and Ad5 codes for two tumor antigens  
starting at different AUG triplets.

Cell, 27, 121.

BOTSTEIN, D., WADDELL, C.H., and KING, J. (1973).

Mechanism of head assembly and DNA encapsulation in Salmonella phage P22. I.  
Genes, proteins, structures and DNA maturation.

J. Mol. Biol. 80, 669.

BOUDIN, M.L., MONCANY, M., D'HALLUIN, J.C., and BOULANGER, P.A.  
(1979).

Isolation and characterization of adenovirus type 2 vertex capsomer (penton  
base).

Virology, 92, 125.

BOUDIN, M.L., D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., and BOULANGER, P.A.  
(1980).

Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation/

Virology, 101, 144.

BOUDIN, M.L., and BOULANGER, P. (1982).

Assembly of adenovirus penton base and fiber.

Virology, 116, 589.

BOUDIN, M.L., RIGOLET, M., LEMAY, P., GALIBERT, F., and BOULANGER, P. (1983).

Biochemical and genetical characterization of a fiber defective temperature sensitive mutant of type 2 adenovirus.

EMBO J., 2, 1921.

BOULANGER, P.A., FLAMENCOURT, P., and BISERTE, G. (1969).

Isolation and comparative chemical study of structure proteins of the adenovirus 2 and 5 : hexon and fiber antigens.

Eur. J. Biochem., 10, 116.

BOULANGER, P.A., and PUVION, F. (1974).

Adenovirus assembly : Cross linking of adenovirus type 2 hexons "in vitro".

Eur. J. Biochem., 43, 465.

BOULANGER, P., DEVAUX, C., and LEMAY, P. (1978a).

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

Virology, 84, 456.

BOULANGER, P.A., DEVAUX, C., and LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1978b).

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

FEBS Letters, 85, 52.

BOULANGER, P.A., LEMAY, P., BLAIR, G.E., and RUSSELL, W.C. (1979).

Characterization of adenovirus protein IX (1979).

J. Gen. Virol., 44, 783.

BURLINGHAM, B.T., DOERFLER, W., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1971).

Adenovirus endonuclease : association with the penton of adenovirus type 2.

J. Mol. Biol., 60, 45.

BURNETT, R.M., GRUTTER, M.G., and WHITE, J.L. (1985a).

The structure of the adenovirus capsid. I. An envelope model of hexon at 6 Å resolution.

J. Mol. Biol., 185, 105.

BURNETT, R.M. (1985b).

The structure of the adenovirus capsid. II. The packing symmetry of hexon and its implications for viral architecture.

J. Mol. Biol., 185, 125.

CARTER, T.H., and BLANTON, R.A. (1978).

Autoregulation of adenovirus type 5 early gene expression. II. Effect of temperature-sensitive early mutations on virus RNA accumulation.

J. Virol., 28, 450.

CASJENS, S. and HUANG, W.M. (1982).

Initiation of sequential packaging of bacteriophage P22 DNA.

J. Mol. Biol., 157, 287.

CASPAR, D.L., and KLUG, A. (1962).

Physical principles in the construction of regular viruses.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 27, 1.

CEPKO, C.L., CHANGELIAN, P.S., and SHARP, P.A. (1981).

Immunoprecipitation with two dimensional pools as a hybridoma screening technique : production and characterization of monoclonal antibodies against adenovirus 2 proteins.

Virology, 110, 385.

CEPKO, C.L., and SHARP, P.A. (1982).

Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a non virion protein.

Cell, 31, 407.

CEPKO, C.L., and SHARP, P.A. (1983).

Analysis of Ad5 hexon and 100K ts mutants using conformation-specific monoclonal antibodies.

Virology, 129, 137.

CHALLBERG, M.D., DESIDERIO, S.V., and KELLY, T.J. (1980).

Adenovirus DNA replication "in vitro" characterization of a protein covalently linked to nascent DNA strands.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5105.

CHALLBERG, M.D., and KELLY, T.J. (1981).

Processing of the adenovirus terminal protein.

J. Virol., 38, 272.

CHARDONNET, Y., and DALES, S. (1970).

Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells. I. Penetration of type 5 and intracellular release of the DNA genome.

Virology, 40, 462.

CHEE SHEUNG, C.C., and GINSBERG, H.S. (1982).

Characterization of a temperature sensitive fiber mutant of type 5 adenovirus and effect of the mutation on virion assembly.

J. Virol., 42, 932.

CHATTERJEE, P.K., VAYDA, M.E., and FLINT, S.J. (1985).

Interactions among the three adenovirus core proteins.

J. Virol., 55, 379.

CHOW, L.T., ROBERTS, J.M., LEWIS, J.B., and BROKER, T.R. (1977).

A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2 determined by electron microscopy of RNA-DNA hybrids.

Cell, 11, 819.

CHOW, L.T., and BROKER, T.R. and LEWIS, J.B. (1979).

Complex splicing patterns of mRNAs from the early regions of Ad2.

J. Mol. Biol., 134, 265.

CLEVELAND, D.W., FISCHER, S.G., KIRSCHNER, M.W., and LAEMMLI, U.K. (1977).

Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis.

J. Biol. Chem., 252, 1102.

CORDEN, J., ENGELKING, M., and PEARSON, G.D. (1976).

Chromatin like organization of the adenovirus chromosome.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 401.

CRICK, F.H.C., and WATSON, J.D. (1957).

In ciba foundation symposium of the nature of viruses..

Wolstenholme Gew and Millar ECP.

DANIELL, E., GROFF, D.E., and FEDOR, M.J. (1981).

Adenovirus chromatin structure at different stages of infection.

Mol. Cell. Biol., 1, 1094.

DE JONG, P.J., KWANT, M.M., Van DRIEL, W., JANSZ, H.S., and Van der VLIET, P.C. (1983).

The ATP requirements of adenovirus type 5 DNA replication and cellular DNA replication.

Virology, 124, 45.

DELSERT, C., and D'HALLUIN, J.C. (1984).

Genetic expression of human adenoviruses in simian cells. Evidence for interserotypic inhibition of viral DNA synthesis.

Virus Research, 1, 365.

DESIDERIO, S.V., and KELLY, T.J. (1981).

Structure of the linkage between adenovirus DNA and the 55,000 molecular weight terminal protein.

J. Mol. Biol., 145, 319.

DEVAUX, C., and BOULANGER, P. (1980).

Reactive serine in human adenovirus hexon polypeptide.

Virology, 102, 94.

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

Molecular weight of adenovirus serotype 2 capsomers. A new characterization.

J. Mol. Biol., 156, 927.

DEVAUX, C., BERTHET-COLOMINAS, C., TIMMINS, P.A., BOULANGER, P.A., and JACROT, B. (1984).

Crystal packing and stoichiometry of the fiber protein of adenovirus type 2.

J. Mol. Biol., 174, 729.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., BOULANGER, P., and MARTIN, G.R. (1978a).

Temperature sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly. Accumulation of light intermediate particles.

J. Virol., 26, 344.

D'HALLUIN, J.C., MARTIN, G.R., TORPIER, G., and BOULANGER, P.A. (1978b).

Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates.

J. Virol., 26, 357.

D'HALLUIN, J.C., MILLEVILLE, M., BOULANGER, P. (1980).

Effects of novobiocin on adenovirus DNA synthesis and encapsidation.

Nuc. Acids. Res., 8, 1625.

D'HALLUIN, J.C. (1980).

Réplication et encapsidation du DNA de l'Adénovirus : Etudes Biochimique et Génétique  
Thèse d'état, Université de Lille I.

D'HALLUIN, J.C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1982).

Physical mapping of adenovirus type 2 temperature-sensitive mutations by restriction endonuclease analysis of interserotypic recombinants.

J. Virol. 41, 401.

DORSETT, P.H., and GINSBERG, H.S. (1975).

Characterization of type 5 adenovirus fiber protein.

J. Virol., 15, 208.

EARNSHAW, W.C., and HARRISON, S.C. (1977).

DNA arrangement in isometric phage heads.

Nature, 268, 598.

EARNSHAW, W.C., and KING, J. (1978).

Structure of phage P22 coat protein aggregates formed in the absence of the scaffolding protein.

J. Mol. Biol., 126, 721.

EARNSHAW, W.C., and CASJENS, S.R. (1980).

DNA packaging by the double-stranded DNA bacteriophages.

Cell, 21, 319.

EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JORNVALL, H., PRAGE, L., and PHILIPSON, L. (1976).

Intermediates in adenovirus assembly.

J. Virol., 19, 533.

EDVARDSSON, B., USTACELEBI, S., WILLIAMS, J., and PHILIPSON, L. (1978).

Assembly intermediates among adenovirus type 5 temperature sensitive-mutants.

J. Virol., 25, 641.

EGGERDING, F.A., and PIERCE, W.C. (1983).

Construction of a cloned library of adenovirus DNA fragments in bacteriophage M13.

J. Biol. Chem., 258, 10090.

EVANS, R.M., FRASER, N., ZIFF, E., WEBER, J., WILSON, M., and DARNELL, J.E. Jr. (1977).

The initiation sites for RNA transcription in adenovirus 2 DNA.

Cell, 12, 733.

EVERITT, E., SUNDQUIST, B., and PHILIPSON, L. (1971).

Mechanism of the arginine requirement for adenovirus synthesis. I. Synthesis of structural proteins.

J. Virol., 8, 742.

EVERITT, E., SUNDQUIST, B., PETTERSSON, U., and PHILIPSON, L. (1973).

Structural proteins of adenovirus X. Isolation and topography of low molecular weight antigens from the virion of adenovirus type 2.

Virology, 52, 130.

EVERITT, E., LUTTER, L., and PHILIPSON, L. (1975).

Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbour relationship among proteins of adenovirion type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation and chemical cross-linking.

Virology, 67, 197.



FADEN, H., GALLAGHER, M., OGRA, P. and Mc LAUGHLIN, S. (1978).  
Nosocomial out break of pharyngo conjunctival fever due to adenovirus type 4.  
New York. Morb. Mort. Week. Rep., 27, 49.

FLEWETT, T.H., BRYDEN, A.S., DAVIES, H., and MORRIS, C.A. (1975).  
Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward.  
Lancet, 1, 4.

FRIEDFELD, B.R., KREVOLIN, M.D., and HORWITZ, M.S. (1983).  
Effects of the adenovirus H5 ts 125 and H5 ts 107 DNA binding proteins on  
DNA replication "in vitro".  
Virology, 124, 380.

FROST, E., and WILLIAMS, J.F. (1978).  
Mapping temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5  
by marker rescue.  
Virology, 91, 39.

FULLER, M.T., and KING, J. (1982).  
Assembly "in vitro" of bacteriophage P22 procapsids from purified coat and  
scaffolding subunits.  
J. Mol. Biol., 156, 633.

GAMBKE, C., and DEPERT, W. (1981a).  
Late non-structural 100,000 and 33,000 dalton proteins of adenovirus type 2. I.  
Subcellular localization during the course of infection.  
J. Virol., 40, 585.

GAMBKE, C., and DEPERT, W. (1981b).  
Late non-structural 100,000 and 33,000 dalton proteins of adenovirus type 2. II.  
Immunological and protein chemical analysis.  
J. Virol., 40, 594.

GAMBKE, C., and DEPERT, W. (1983).  
Specific complex of the late non structural 100,000 dalton protein with newly  
synthetised hexon in adenovirus type 2-infected cells.  
Virology, 124, 1.

GILEAD, Z., JENG, Y.H., WOLD, W.S.M., SUGAWARA, K., RHO, H.M.,  
HARTER, M.L., and GREEN, M. (1976).

Immunological identification of two adenovirus 2-induced early proteins possibly  
involved in cell transformation.

Nature, 264, 263.

GINGERAS, T.R., SCIAKY, D., GELINAS, R.E., BING-DONG, J., YEN, C.E.,  
KELLY, M.H., BULLOCK, P.A., PARSONS, B., O'NEIL, K.E., and ROBERTS,  
R.J. (1982).

Nucleotide sequences from the adenovirus 2 genome.

J. Biol. Chem., 257, 13475.

GINSBERG, H.S., ENSINGER, M.S., KAUFFMAN, R.S., MAYER, A.J., and  
LONDHOLM, U. (1974).

Cell transformation : a study of regulation with type 5 and 12 adenovirus  
temperature-sensitive mutants.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 412.

GOLDENBERG, D.P., BERGET, P.B., KING, J. (1982).

Maturation of the tail spike endorhamnosidase of Salmonella phage P22.

J. Biol. Chem., 257, 7864.

GRAHAM, F.L., ABRAHAMS, P.J., MULDER, C., HEIJNEKER, H.L.,  
WARNAAR, S.O., De VRIES, F.A.J., FIERS, W., and Van der EB, A.J.  
(1974a).

Studies on in vitro transformation by DNA and RNA fragments of human  
adenoviruses and SV40.

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 637.

GRAHAM, F.L., Van der EB, A.J., and HEIJNEKER, H.L. (1974b).

Size and location of the transforming region in human adenovirus type 5 DNA.

Nature, 251, 687.

GREEN, M., and PINA, M. (1963).

Biochemical studies on adenovirus multiplication. IV. Isolation, purification and  
chemical analysis of adenovirus.

Virology, 20, 199.

GREEN, M., MACKEY, J.K., WOLD, W.S.M., and RIGDEN, P. (1979).  
Thirty-one human adenovirus serotypes (Ad1-Ad31) form five groups (A-E)  
based upon DNA genome homologies.

Virology, 93, 481.

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

Evidence for a repeating cross-B sheet structure in the adenovirus fibre.

EMBO J., 2, 1357.

GRIFFIN-SHEA, R. (1977).

PhD Thesis, Massachusetts Institute of Technology.

HALBERT, D.N., CUTT, J.R., and SHENK, T. (1985).

Adenovirus early region 4 encodes functions required for efficient DNA  
replication, late gene expression, and host cell shutoff.

J. Virol., 56, 250.

HAMMARSKJOLD, M.L., and WINBERG, G. (1980).

Encapsidation of Ad16 DNA is directed by a small DNA sequence at the left end  
of the genome.

Cell, 20, 787.

HANDA, H., KINGSTON, R.E., and SHARP, P.A. (1983).

Inhibition of adenovirus early region IV transcription in vitro by a purified  
viral DNA binding protein.

Nature, 302, 545.

HARTER, M., and LEWIS, J.B. (1978).

Adenovirus type 2 early proteins synthesised in vitro and in vivo :  
Identification in infected cells of the 38,000 to 50,000 molecular weight protein  
encoded by the left end of the adenovirus type 2 genome.

J. Virol., 26, 736.

HASSEL, J.A., and WEBER, J. (1978).

Genetic analysis of adenovirus type 2 : VIII physical locations of temperature  
sensitive mutations.

J. Virol., 28, 671.

HENNACHE, B., and BOULANGER, P. (1977).

Biochemical study of KB cells receptor for adenovirus.

Biochem. J., 166, 237.

HERISSE, J., COURTOIS, G., and GALIBERT, F. (1980).

Nucleotide sequence of the Eco RI D fragment of adenovirus 2 genome.

Nucl. Acids. Res., 8, 2173.

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

Nucleotide sequence of adenovirus 2 DNA fragment encoding for the carboxylic region of the fiber protein and the entire E4 region.

Nucl. Acids. Res., 9, 4023.

HILLEMANN, M.R., and WERNER, J.H. (1954).

Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 85, 183.



HILLEMANN, R.J., WERNER, J.H., and STEWART, M.T. (1955).

Grouping and occurrence of RI (prototype RI 67) viruses.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 555.

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

The icosahedral form of an adenovirus.

J. Mol. Biol., 1, 84.

HORWITZ, M.S., SCHARFF, M.D., and MAIZEL, J.V. Jr. (1969).

Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion.

Virology, 39, 682.

HOSAKAWA, K., and SUNG, M.T. (1976).

Isolation and characterization of an extremely basic protein from adenovirus type 5.

J. Virol., 17, 924.

HOUWELING, A., Van den ELSEN, P.J., and Van der EB, A.J. (1980).

Partial transformation of primary rat cells by the left-most 4,5 % fragment of adenovirus 5 DNA.

Virology, 105, 537.

HUEBNER, R.J., ROWE, W.P., and LANE, W.T. (1962).

Oncogenic effects in hamsters of adenovirus types 12 and 18.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48, 2051.

HUEBNER, R.J. (1967).

Adenovirus-directed tumor and T antigens.

In Perspectives in Virology, Vol. 5, Acad. Press. New York, 147 Ed. by Pollard M.

ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J.V. Jr. (1974).

The polypeptides of adenovirus V. Young virions, structural intermediate between top component and aged virions.

Virology, 57, 409.

JORNVALL, H., PETTERSSON, U., PHILIPSON, L. (1974a).

Structural studies of adenovirus type 2 hexon protein.

Eur. J. Biochem., 48, 179.

JORNVALL, H., OHLSSON, H., and PHILIPSON, L. (1974b).

An acetylated N-terminus of adenovirus 2 hexon protein.

Biochem. Biophys. Res. Comm., 56, 304.

JORNVALL, H., AKUSJARVI, G., ALESTROM, P., Von BAHR-LINDSTROM, H., PETTERSSON, U., APPELLA, E., FOWLER, A., and PHILIPSON, L. (1981).

The adenovirus hexon protein : the primary structure of the polypeptide and its correlation with the hexon gene.

J. Biol. Chem., 256, 6181.

KING, J., and CASJENS, S. (1974).

Catalytic head assembling protein in virus morphogenesis.

Nature, 251, 112.

KING, J. (1980).

Regulation of structural protein interactions as revealed in plage morphogenesis.

Biological regulation and developpment, 2, 101 (Ed. Golberg, R.F.).

KLESSIG, D.F., and ANDERSON, C.W. (1975).

Block to multiplication of adenovirus serotype 2 in monkey cells.

J. Virol., 16, 1650.

KRUIJER, W., Van SCHAIK, F.M.A., and SUSSENBACH, J.S. (1980).

Nucleotide sequence analysis of a region of adenovirus 5 DNA encoding an hitherto unidentified gene.

Nucl. Acids. Res., 8, 6033.

LECHNER, R.L., and KELLY, T.J. Jr (1977).

The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules.

Cell, 12, 1007.

LEIBOWITZ, J., and HORWITZ, M.S. (1975).

Synthesis and assembly of adenovirus polypeptides. III. Reversible inhibition of hexon assembly in adenovirus type 5 temperature-sensitive mutants.

Virology, 66, 10.

LEMAY, P., and BOULANGER, P. (1980).

Physicochemical characteristics of structural and non structural proteins of human adenovirus 2.

Ann. Virol. Inst. Pasteur, 131, 259.

LEMAY, P., BOUDIN, M.L., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P.A. (1980).

Human adenovirus type 2 protein IIIa. I. Purification and characterization.

Virology, 101, 131.

LEVINE, A.J., and GINSBERG, H.S. (1967).

Mechanism by which fiber antigen inhibits multiplication of type 5 adenovirus.

J. Virol., 1, 747.

LEWIS, J.B., ATKINS, J.F., BAUM, P.R., SOLEM, R., GESTELAND, R.F., and ANDERSON, C.W. (1976).

Location and identification of the genes for adenovirus type 2 early peptides.  
Cell, 7, 141.

LEWIS, J.B., ANDERSON, C.W., and ATKINS, J.F. (1978).

Further mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization to specific DNA fragments.

Cell, 12, 37.

LEWIS, J.B., FAHNESTOCK, M.L., HARDY, M.M., and ANDERSON, C.W. (1985).

Presence in infected cells of nonviral proteins encoded by adenovirus messenger RNAs of the major late transcription regions L0 and L1.

Virology, 143, 452.

LICHY, J.H., FIELD, J., HORWITZ, M.S., and HURWITZ, J. (1982).

Separation of the adenovirus terminal protein precursor from its associated DNA polymerase : role of both proteins in the initiation of adenovirus DNA replication.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5225.

LOGAN, J., NICOLAS, J.C., TOPP, W.C., GIRARD, M., SHENK, T., and LEVINE, A.J. (1981).

Transformation by adenovirus early region 2A temperature-sensitive mutants and their revertants.

Virology, 115, 419.

LONDBERG-HOLM, K., and PHILIPSON, L. (1969).

Early events of virus-cell interaction in an adenovirus system.

J. Virol., 4, 323.

LUFTIG, R.B., and WEIHING, R.R. (1975).

Adenovirus binds to rat brain microtubules in vitro.

J. Virol., 16, 696.

LYON, M., CHARDONNET, Y., and DALES, S. (1978).

Early events in the interaction of adenoviruses with HeLa cells.

Virology, 87, 81.

MAIZEL, J.V. Jr., WHITE, D.O., and SCHARFF, M.D. (1968a).

The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virion and a comparison of types 2, 7 and 12.

Virology, 36, 115.

MAIZEL, J.V. Jr., WHITE, D.O., and SCHARFF, M.D. (1968b).

The polypeptides of adenovirus. II. Soluble proteins, cores, top components and the structure of the virion.

Virology, 36, 126.

MARTIN, G.R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALLUIN, J.C., and BOULANGER, P. (1978).

Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants.

J. Gen. Virol., 41, 303.

MARUZYK, R.G., MORGAN, A.R., and WADELL, G. (1975).

Association of endonuclease activity with serotypes belonging to the three subgroups of human adenoviruses.

J. Virol., 16, 456.

MATHEWS, M.B. (1975).

Genes for VA-RNA in adenovirus 2.

Cell, 6, 223.

MESSING, J. (1983).

New M13 vectors for cloning. *Methods in enzymology*.

Recombinant DNA techniques 101 part C, pp 20-78.

MILLER, J.S., RICCIARDI, R.J., ROBERTS, B.E., PATERSON, B.M., and MATHEWS, M.B. (1980).

Arrangement of messenger RNAs and protein coding sequences in the major late transcription unit of adenovirus 2.

J. Mol. Biol., 142, 455.

MIRZA, M.A., and WEBER, J. (1982).

Structure of adenoviruses chromatin.

Biochem. Biophys. Acta, 696, 76.



NAGATA, K., GUGGENHEIMER, R.A., ENOMOTO, T., LICHY, J.H. and HURWITZ, J. (1982).

Adenovirus DNA replication in vitro : identification of a host factor that stimulates synthesis of the preterminal protein-dCMP complex.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6438.

NATARAJAN, V., MADDEN, M.J., and SALZMAN, N.P. (1984).

Proximal and distal domains that control "in vitro" transcription of the adenovirus IVa<sub>2</sub>-gene.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6290.

NATARAJAN, V., MADDEN, M.J., and SALZMAN, N.P. (1985).

Positive and negative control sequences within the distal domain of the adenovirus IVa<sub>2</sub> promoter overlap with the major late promoter.

J. Virol., 55, 10.

NEVINS, J.R., and JENSEN-WINKLER, J. (1980).

Regulation of early adenovirus transcription : a protein product of early region 2 specifically represses region 4 transcription.

Proc. Natl. Sci. USA, 77, 1893.

NEVINS, J. (1981).

Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product.

Cell, 26, 213.

NEVINS, J.R., and WILSON, M.C. (1981).

Regulation of adenovirus-2 gene expression at the level of transcriptional termination and RNA processing.

Nature, 290, 113.

NEURATH, A.R., RUBIN, B.A., and STASNY, J.T. (1968).

Cleavage by formamide of intercapsomer bonds in adenovirus types 4 and 7 virions and hemagglutinins.

J. Virol., 2, 1086.

NICOLAS, J.C., SARNOV, P., GIRARD, M., and LEVINE, A.J. (1983).

Host range temperature-conditional mutants in the adenovirus DNA Binding Protein are defective in the assembly of infectious virus.

Virology, 126, 228.

NORRBY, E., and SKAARE, T.P. (1967).

The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. III. Immunological identification of fiber antigen and isolated vertex capsomer antigen.

Virology, 32, 489.

NORRBY, E. (1969).

The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. IV. Immunological complexity of soluble components.

Virology, 37, 565.

OBORG, B., SABORIO, J., PERSSON, T., EVERITT, E., and PHILIPSON, L. (1975).

Identification of the in vitro translation products of adenovirus mRNA by immunoprecipitation.

J. Virol., 15, 199.

OOSTEROM-DRAGON, E.A., and GINSBERG, H.S. (1980).

Purification and preliminary immunological characterization of the type 5 adenovirus, nonstructural 100,000 dalton protein.

J. Virol., 33, 1203.

OOSTEROM-DRAGON, E.A., and GINSBERG, H.S. (1981).

Characterization of two temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus with mutations in the 100,000 dalton protein gene.

J. Virol., 40, 491.

OOSTEROM-DRAGON, E.A., and ANDERSON, C.W. (1983).

Polypeptide structure and encoding location of the adenovirus serotype 2 late, nonstructural 33 K protein.

J. Virol., 45, 251.

PEREIRA, H.G. (1958).

A protein factor responsible for the early cytopathic effect of adenoviruses.

Virology, 6, 601.

PEREIRA, H.G., VALENTINE, R.C., and RUSSELL, W.C. (1968).

Crystallization of an adenovirus protein (the hexon).

Nature, 219, 946.

PEREIRA, H.G., and WRIGLEY, N.G. (1974).

In vitro reconstitution, hexon bonding and handedness of incomplete adenovirus capsid.

J. Mol. Biol., 85, 617.

PERRICAUDET, M., AKUSJARVI, G., VIRTANEN, A., and PETTERSSON, U. (1979).

Structure of two spliced mRNAs from the transforming region of human subgroup C adenoviruses.

Nature, 281, 694.

PERSOON, H., OBERG, B., and PHILIPSON, L. (1977).

In vitro translation with adenovirus polyribosomes.

J. Virol., 21, 187.

PERSOON, H., PETTERSSON, U., and MATHEWS, M.B. (1978).

Synthesis of a structural adenovirus polypeptide in the absence of viral DNA replication.

Virology, 90, 67.

PERSOON, H., SIGNAS, C., and PHILIPSON, L. (1979a).

Purification and characterization of an early glycoprotein from adenovirus type 2 infected cells.

J. Virol., 29, 938.

PERSOON, H., MATHISEN, B., PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U. (1979b).

A maturation protein in adenovirus morphogenesis.

Virology, 93, 198.

PETTERSSON, U., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S. (1967).

Structural proteins of adenoviruses. I. Purification and characterization of adenovirus type 2 hexon antigen.

Virology, 33, 575.

PETTERSSON, U., and HOGLUND, S. (1969).

Structural proteins of adenoviruses : III. Purification and characterization of adenovirus type 2 hexon antigen.

Virology, 39, 90.

PETTERSSON, U. (1971).

Structural protein of adenoviruses. VI. On the antigenic determinants of the hexon.

Virology, 43, 123.

PETTERSSON, U., TIBBETTS, C., and PHILIPSON, L. (1976).

Hybridization maps of early and late messenger RNA sequences on the adenovirus type 2 genome.

J. Mol. Biol., 101, 479.

PHILIPSON, L., LONBERG-HOLM, K., and PETTERSSON, U. (1968).

Virus receptor interaction in an adenovirus system.

J. Virol., 2, 1064.

PHILIPSON, L., and PETTERSSON, U. (1973).

Structure and function of virion proteins of adenoviruses.

Progr. Exp. Tumor Virus Res., 18, 1.

PHILIPSON, L., and LINDBERG, U. (1974).

Reproduction of adenoviruses.

In : Comprehensive Virology. (Fraenkel-Conrat and R. Wagner, Eds).

Vol. 3, 143.

Plenum Press - New York - London.

PHILIPSON, L. (1983).

Structure and assembly of adenoviruses.

In Current Topics in microbiology and immunology. The molecular biology of adenoviruses.

Vol. 109, 1

(Ed. Doerfler W.).

PINA, M., and GREEN, M. (1965).

Biochemical studies on adenovirus multiplication. IX. Chemical and base composition analysis of 28 human adenoviruses.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 54, 547.

POTEETE, A.R., and KING, J. (1977).

Functions of two new genes in Salmonella phage 22 assembly.

Virology, 76, 725.

POTEETE, A.R., JARVIK, V., and BOTSTEIN, D. (1979).

Encapsulation of phage P22 DNA "in vitro".

Virology, 95, 550.

PRAGE, L., and PETTERSSON, U. (1971).

Structural proteins of adenoviruses. VII. Purification and properties of an arginine-rich core protein from adenovirus type 2 and type 3.

Virology, 45, 364.

REKOSH, D.M.K., RUSSELL, W.C., BELLET, A.J.D., and ROBINSON, A.J. (1977).

Identification of a protein linked to the ends of adenovirus DNA.

Cell, 11, 283.

RHOADES, M., Mc HATTIE, L., and THOMAS, C. (1968).

The P22 bacteriophage DNA molecule. I. The mature form.

J. Mol. Biol., 37, 21.

RICHARDSON, W.D., and WESTPHAL, H. (1981).

A cascade of adenovirus early functions is required for expression of adeno associated virus.

Cell, 27, 133.

ROSEN, L. (1958).

Hemagglutination of adenovirus.

Virology, 5, 574.

ROSS, S.R., FLINT, S.J., and LEVINE, A.J. (1980).

Identification of the adenovirus early proteins and their genomic map positions.

Virology, 100, 419.

ROWE, W.P., HARTLEY, J.W., ROIZMANN, B., and LEVEY, H.B. (1958).

Characterization of a factor formed in the course of adenovirus infection of tissue cultures causing detachment of cells from glass.

J. Exp. Med., 108, 713.

RUSSELL, W.C., and SKEHEL, J.J. (1972).

The polypeptides of adenovirus infected cells.

J. Gen. Virol., 15, 45.

RUSSELL, W.C., and PRECIOUS, B. (1982).

Nucleic acid-binding properties of adenovirus structural polypeptides.

J. Gen. Virol., 63, 69.

SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A.R. (1977).

DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 5463.

SARNOW, P., HEARING, P., ANDERSON, C.W., REICH, N., and LEVINE, A.J. (1982).

Identification and characterization of an immunologically conserved adenovirus early region 11,000 protein and its association with the nuclear matrix.

J. Mol. Biol., 162, 565.

SARNOW, P., HEARING, P., ANDERSON, C.W., HALBERT, D.H., SHENK, T., and LEVINE, A.J. (1984).

Adenovirus E1b 58 Kd tumor antigen is physically associated with an E4-25 Kd protein in productively infected cells.

J. Virol., 49, 692.

SCHRIER, P.I., Van den ELSEN, P.J., HERTOOGHS, J.J.L., and Van der EB, A. (1979).

Characterization of tumor antigens in cells transformed by fragment of adenovirus type 5 DNA.

Virology, 99, 372.

SERGEANT, A., TIGGES, M.A., and RASKAS, H.J. (1979).

Nucleosome-like structural subunits of intranuclear parental adenovirus type 2 DNA.

J. Virol., 29, 888.

SHAW, A.R., and ZIFF, E.B. (1980).

Transcripts from the adenovirus 2 major late promoter yield a single early family of 3' coterminal mRNAs and five late families.

Cell, 22, 905.

SHAW, A.R., and ZIFF, E.B. (1982).

Selective inhibition of adenovirus type 2 early regions II and III transcription by an anisomycin block of protein synthesis.

Mol. Cell. Biol., 2, 789-799.

SCHNEIDER, R.J., WEINBERGER, C., and SHENK, T. (1984).

Adenovirus VA I RNA facilitates the initiation of translation in virus infected cells.

Cell, 37, 291.

SMART, J.E., LEWIS, J.B., MATHEWS, M.B., HARTER, M.L., and ANDERSON, C.W. (1981).

Adenovirus type 2 early proteins : assignment of the early region 1A proteins synthesized in vivo and in vitro to specific mRNAs.

Virology, 112, 703.

STINSKI, M.F., and GINSBERG, H.S. (1974).

Antibody to the type 5 adenovirus hexon polypeptide : detection of nascent polypeptides in the cytoplasm of infected KB cells.

Intervirology, 4, 226.

STILLMAN, B.W., TAMANOI, F., and MATHEWS, M.B. (1982).

Purification of an adenovirus coded DNA polymerase that is required for initiation of DNA replication.

Cell, 31, 613.

STRAUSS, H., and KING, J. (1984).

Steps in the stabilization of newly packaged DNA during phage P22 morphogenesis.

J. Mol. Biol., 172, 523.

SUNDQUIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L., and HOGLUND, S. (1973).

Assembly of adenoviruses.

J. Virol., 11, 449.

SUNG, M.T., LISCHWE, M.A., RICHARDS, J.C., and HOSOKAWA, K. (1977).

Adenovirus chromatin. I. Isolation and characterization of the major core protein VII and precursor Pro-VII.

J. Biol. Chem., 252, 4981.

SUNG, M.T., CAO, T.M., COLEMAN, R.T., and BUDELIER, K.A. (1983).

Gene and protein-sequences of adenovirus protein VII, a hybrid basic chromosomal protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 2902.

SUSSENBACH, J.S., Van der VLIET, P.C., ELLENS, D.J., and JANSZ, H.S. (1972).

Linear intermediates in the replication of adenovirus DNA.

Nature (New Biol.), 239, 47.

TASSERON - de JONG, J.G., BROUWER, J.C., RIETVELD, K., ZOETEMELK, E.M., and BOSCH, L. (1979).

Messenger ribonucleoprotein complexes in human KB cells infected with adenovirus type 5 contain tightly bound viral coated "100 K" proteins.

Eur. J. Biochem., 100, 271.

TATE, V.E., and PHILIPSON, J. (1979).

Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells.

Nucl. Acid Res., 6, 2769-2785.

THIMMAPPAYA, B., WEINBERGER, C., SCHNEIDER, R.J., and SHENK, T. (1982).

Adenovirus VAIRNA is required for efficient translation of viral mRNAs at late timeq after infection.

Cell, 31, 543.

VALENTINE, R.C., and PEREIRA, H.G. (1965).

Antigens and structure of the adenovirus.

J. Mol. Biol., 13, 13.

Van den ELSEN, P.J., HOUWELING, A., and Van der EB, A.J. (1983a).

Morphological transformation of human adenoviruses is determined to a large extent by gene products of region E1A.

Virology, 131, 242.

Van den ELSEN, P.J., HOUWELING, A., and Van der EB, A.J. (1983b).

Expression of region E1b of human adenoviruses in the absence of a region E1A is not sufficient for complete transformation.

Virology, 128, 377.

Van der VLIET, P.C., and LEVINE, A.J. (1973).

DNA binding proteins specific for cells infected by adenovirus.

Nature (New Biol.), 246, 170.



Van OOSTRUM, J., and BURNETT, R.M. (1985).

Molecular composition of the adenovirus type 2 virion.

J. Virol., 56, 439.

VAYDA, M.E., ROGERS, A.E., and FLINT, S.J. (1983).

The structure of nucleoprotein core released from adenovirions

Nucl. Acid Res., 11, 441.

VELICER, L.F., and GINSBERG, H.S. (1970).

Synthesis, transport and morphogenesis of type 5 adenovirus capsid proteins.

J. Virol., 5, 338.

VIRTANEN, A., and PETTERSSON, U. (1983).

The molecular structure of the 9 S mRNA from early region 1A of adenovirus serotype 2.

J. Mol. Biol., 165, 496.

WALLACE, R.D., and KATES, J. (1972).

State of adenovirus 2 deoxyribonucleic acid in the nucleus and its mode of transcription : studies with isolated viral deoxyribonucleic acid-protein complexes and isolated nuclei.

J. Virol., 9, 627.

WALTER, G., and MAIZEL, J.V. Jr. (1974).

The polypeptides of adenovirus. IV. Detection of early and late virus induced polypeptides and their distribution in subcellular fractions.

Virology, 57, 402.

WEBER, J. (1976).

Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature sensitivity of processing of viral proteins.

J. Virol., 17, 462.

WEBER, J., and KHITTOO, G. (1983).

The role of phosphorylation and core protein V in adenovirus assembly.

J. Gen. Virol., 64, 2063.

WEINMANN, R., RASKAS, H.J., and ROEDER, R.G. (1974).

Role of DNA-dependent RNA polymerases II and III in transcription of the adenovirus genome late in productive infection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 3426.

WHITE, D.O., SHARFF, M.D., MAIZEL, J.V. Jr. (1969).

The polypeptides of adenoviruses. III. Synthesis in infected cells.

Virology, 38, 395.

WILLIAMS, J.F. (1973).

Oncogenic transformation of hamster embryo cells in vitro by adenovirus type 5.

Nature, 243, 162.

WRIGHT, A., Mac CONNELL, M., and KANEGASAKI, S. (1980).

Virus receptors.

Eds Randall L. and Philipson, L. Chapman and Hall London, pp27.

ZIFF, E.B. (1980).

Transcription and RNA processing by the DNA tumor viruses.

Nature, 287, 491.

A N N E X E S

## Morphogenesis of Human Adenovirus Type 2: Sequence of Entry of Proteins into Previrial and Viral Particles

NATHALIE MORIN AND PIERRE BOULANGER<sup>1</sup>

*Laboratoire de Virologie Moléculaire de l'INSERM (U. 233), Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France*

*Received February 14, 1984; accepted March 20, 1984*

The initial steps of adenovirus capsid morphogenesis and the sequence of entry of structural and nonstructural proteins into assembly-intermediate (IM) particles were investigated by pulse-chase labeling, temperature shifts, and cycloheximide inhibition of particle formation. The experiments were performed on wild-type and two assembly-defective, temperature-sensitive mutants, H2 *ts* 112 and H2 *ts* 107. The sequence of events in the adenovirus assembly can be schematized as follows. (i) Hexons, pentons, and protein IX assembled with scaffolding proteins 100K, PVIII, and PVII, precursor to the major core protein, to form a previral particle banding at a density of 1.285 in CsCl; (ii) additional incorporation of maturation and/or stabilization proteins IIIa, 50K, 39K, 28K, and PVI led to 1.295 IM; (iii) exit of 100K, 39K, and 28K, and entry of viral DNA gave rise to 1.370 IM; (iv) dephosphorylation and/or exit of 50K and exchange with core protein V and processing of precursors to VII, VI, VIII, and DNA-terminal protein resulted in formation of infectious 1.345 virion. The polypeptide composition of the new class of assembly-intermediate particles elicited by H2 *ts* 107 (1.285 IM), suggested that 100K, PVIII, and also PVII might serve as scaffold components for adenovirus capsid building.

### INTRODUCTION

As a result of biochemical and genetic studies, several types of incomplete particles have been identified as structural intermediate steps of the adenovirus morphogenesis pathway (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976, 1978; Ishibashi and Maizel, 1974; Sundquist *et al.*, 1973). Light, empty capsids precede heavy intermediates containing full-length DNA, but lacking the core structure (D'Halluin *et al.*, 1978a). Encapsidation or modification of core proteins leads to immature, non-infectious viruses, the so-called young virions (D'Halluin *et al.*, 1978a; Edvardsson *et al.*, 1976; Ishibashi and Maizel, 1974). After cleavage of the precursors to capsid proteins VI and VIII, and to core protein VII, the young virions become mature, infectious virions (Anderson *et al.*, 1973; Boudin *et al.*, 1980; Edvardsson *et al.*, 1976; Ishibashi and Maizel, 1974). The sequence of events has been reviewed recently (Tooze, 1980).

<sup>1</sup> Author to whom requests for reprints should be addressed.

Assembly of adenovirus capsid components seems to require partner proteins, in order to build the virus structural subunits and the intermediate particles correctly. Thus, the late, virus-coded 100K protein appears indispensable to the assembly of functional hexons, the major capsid subunits (Cepko and Sharp, 1982; Gambke and Deppert, 1983; Leibowitz and Horwitz, 1975; Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1980, 1981). Phosphoproteins 50K and 39K, on the other hand, have been suggested to be scaffolding proteins for the light assembly-intermediate particles (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976; Ginsberg, 1979; Ishibashi and Maizel, 1974; Persson *et al.*, 1979; Philipson, 1979). Despite all these studies, the successive steps and the mechanism of adenovirus capsid building and of particle stabilization following the exit of possible scaffolding proteins and the entry of viral DNA and core proteins, remain poorly understood in terms of protein rearrangements or protein-DNA interactions.

In the present study, the initial steps of adenovirus 2 particle assembly and the

maturation of the previral particles were investigated with the aid of the wild-type (WT) and two assembly-defective, temperature-sensitive (*ts*) mutants, H2 *ts* 112 and H2 *ts* 107 (D'Halluin *et al.*, 1981; 1978b; Martin *et al.*, 1978). H2 *ts* 112 has been found to accumulate empty particles banding at a density of 1.315 in CsCl and capable of maturation into infectious virions upon shift-down (D'Halluin *et al.*, 1978b). H2 *ts* 107 fails to assemble capsid components that are normally synthesized at the nonpermissive temperature (Martin *et al.*, 1978). Partial disruption and polypeptide analysis of virions and assembly intermediate particles obtained in pulse-chase labeling, temperature-shift, and/or cycloheximide block experiments, gave insights into the sequential entrance of proteins into the capsid. This constituted an approach to the problem of the biological function of the so-called "minor" capsid proteins (Ginsberg, 1979; Philipson, 1979).

#### MATERIALS AND METHODS

*Cells and virus.* HeLa cells were grown as monolayers in Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum. KB cells were grown in suspension in Joklik-modified medium F<sub>13</sub> (Difco) supplemented with 5% horse serum. They were infected at a multiplicity of 100 fluorescent focus units per cell (D'Halluin, 1978a) at 37° for the WT, at 33° (the permissive temperature) or at 39.5° (the nonpermissive temperature) for the *ts* mutants. H2 *ts* 112 and H2 *ts* 107 have been isolated in our laboratory after nitrous acid mutagenesis (Martin *et al.*, 1978).

*Isolation and purification of mature virions (MV) and assembly-intermediate (IM) particles.* Since the IM particles produced by H2 *ts* 112 at 39.5° were found to be rather resistant to high salt, even without fixation (D'Halluin *et al.*, 1978b; and unpublished observations), a rapid technique of isolation in CsCl gradient was developed. Infected cells were harvested late after infection (16-20 hr), centrifuged at low speed, suspended in 0.01 M Tris-hydrochloride, pH 8.1, and disrupted by three cycles of

freezing and thawing. The cell lysate was thoroughly mixed with an equal volume of Freon 113 (Boudin *et al.*, 1980) and the aqueous phase centrifuged at 32 krpm in a Kontron TST 60 rotor for 1 hr at 4°, on a cushion of CsCl (density 1.43). The particle band over the cushion was collected and the different classes of virus particles were further separated on a preformed discontinuous gradient of CsCl in glycerol. The lower phase consisted of CsCl at density 1.45 in 40% glycerol, the intermediate layer of 1.33 CsCl in 20% glycerol, and the upper phase of 1.25 CsCl in 5% glycerol. The gradient was constituted of 1 ml of each phase, and overlaid with 1.0 ml of the virus particle suspension. Centrifugation was performed in a Kontron TST 60 rotor for 3.5 hr at 38 krpm and at 4°. Mature virions ( $\rho$ : 1.34) accumulated at the interphase of the 1.33-1.41 layer, the incomplete particles ( $\rho$ : 1.29-1.30) over the 1.33 phase, and the soluble antigens banded at the top of the gradient in the 1.25 zone. The virions and intermediate particles were then re-banded in preformed continuous CsCl gradients (ranging from 1.36 to 1.26 in density) for 3 hr at 30 krpm in the Beckman SW41 rotor.

In some experiments IM particles were isolated in a sucrose gradient. The gradients containing 25 to 40% sucrose in 0.05 M Tris-hydrochloride, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 0.01 M sodium EDTA were centrifuged at 85,000 *g* and 4° for 105 min in a Beckman SW27 rotor over a cushion of CsCl ( $\rho$ : 1.43). The IM particles sedimented at about 600 S (D'Halluin *et al.*, 1978a, b).

*Partial disruption of adenovirus particles and isolation of subviral entities.* Adenovirus has been shown to be readily dissociated by heating for 90 sec at 56° in 0.5% sodium deoxycholate (Boulanger *et al.*, 1979). Virus and assembly-intermediate particles were dialyzed against 0.01 M Tris-hydrochloride, pH 8.1, disrupted with 0.5% deoxycholate, and the nucleoprotein core (180-200 S) groups of nine hexons (30-50 S) and free capsomers (3-13 S) isolated by centrifugation in a 10-40% glycerol gradient for 90 min, at 35 krpm and 4°, in a Beckman SW41 rotor (Boulanger *et al.*, 1979).

*Pulse-chase labeling conditions.* A 60- to 80-min period is required to form an assembly-intermediate particle and the same time for an IM particle to evolve into a mature virion (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976; Sundquist *et al.*, 1973). Infected cells taken at 16 hr after infection were centrifuged at 37° for 5 min at low speed and resuspended at a concentration of  $2 \times 10^7$  cells/ml in a prewarmed medium deficient in the amino acid used for labeling. Labeling was performed with [ $^{14}\text{C}$ ]valine (2-5  $\mu\text{Ci/ml}$ ), [ $^3\text{H}$ ]valine (20  $\mu\text{Ci/ml}$ ), or [ $^{35}\text{S}$ ]methionine (5-20  $\mu\text{Ci/ml}$ ), for 0.5 to 1 hr at 37 or 39.5° and for 2 hr at 33°. After the pulse, the cells were centrifuged, diluted to a cell density of  $2-5 \times 10^5$  cells/ml in medium containing a 10-fold excess of cold valine or cold methionine. Cell samples were withdrawn at different time intervals during the chase period at 37, 39.5, or 33°, as indicated in the text. Protein synthesis and IM particle formation were blocked by cycloheximide (20  $\mu\text{g/ml}$ ).

*Analytical polyacrylamide gel electrophoresis.* Samples were dissolved in an equal volume of sample buffer (0.0625 M Tris-hydrochloride, pH 6.8, containing 6 M urea, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.005% bromophenol blue, and heated for 2 min at 100°. Polypeptides were analyzed in an SDS-containing 17.5% polyacrylamide gel (acrylamide/bis-acrylamide ratio of 50:0.235) overlaid by a 5% spacer gel (acrylamide/bis-acrylamide ratio of 50:1.33) in the discontinuous buffer system of Laemmli (1970). The gels were stained with Coomassie brilliant blue R-250, dried under vacuum, and exposed to Kodak Royal X-Omat S film.

Analysis of double-labeled material was carried out as follows. Each polypeptide was identified on the stained gel by the position of the corresponding band of virion marker electrophoresed in a lateral slot, and the gel track cut into 2-mm slices. The gel slices were dissolved in 0.2 ml of 60% perchloric acid and 0.4 ml of 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 1 hr at room temperature and the  $^3\text{H}$  +  $^{14}\text{C}$ -labeled samples counted in aqueous scintillation fluid (Aqualyte, Amersham, U. K.), in a liquid scintillation spectrometer

(Intertechnique, France) corrected for channel overflow.

*Electron microscopy.* Samples were stained with 1% uranyl formate, buffered with 0.1 M Na-cacodylate, pH 7.0, and examined in a Hitachi HU-12 electron microscope.

*Chemicals and radioisotopes.* Sodium deoxycholate (DOC) was purchased from BDH (Poole, U. K.). A 10% solution (w/v) was made in water and dialyzed in the cold against distilled water. The dialyzable fraction obtained was lyophilized and used for virus disruption. Cycloheximide (CH) was purchased from Boehringer (Mannheim, Federal Republic of Germany), and used at a concentration of 20  $\mu\text{g/ml}$  of cell culture. L-[ $^{35}\text{S}$ ]methionine (1400 to 1500 Ci/mmol) was purchased from the Radiochemical Centre (Amersham, U. K.), [ $^3\text{H}$ ]valine (1 Ci/mmol) and [ $^{14}\text{C}$ ]valine (275 mCi/mmol) from the Commissariat à l'Energie Atomique (Saclay, France).

## RESULTS

### *Fate of Label in the Different Parts of the WT Virion and Assembly-Intermediate (IM) Particle*

Centrifugation of deoxycholate (DOC)-disrupted virus particles in a glycerol gradient separated the virus material into nucleoprotein core, groups of nine hexons, free capsomers, and DOC-released proteins, the latter mainly belonging to the apical zones of the virus icosahedron. Thus, the top of the gradient contained penton base (polypeptide III), fiber (IV), protein IIIa, and peripentonal hexons (polypeptide II), i.e., the five hexons surrounding each penton (Boulanger *et al.*, 1979; Philipson, 1979). However, the distinction between core, groups of nine hexons originating from the capsid faces and edges, and vertices was purely strategic and may not correspond *stricto sensu* to topologically defined virus parts. For example, the two pairs of precursor-products PVI-VI, and PVIII-VIII, were found at the top of the gradient, cosedimenting with the vertex components II, III, IIIa, and IV. Capsid components VI and VIII have been found as hexon-associated proteins, and may also

be present in the icosahedral faces (Everitt *et al.*, 1975; Philipson, 1979).

WT-infected HeLa cells maintained at 37° were labeled with [<sup>14</sup>C]valine for 1 hr at 16 hr after infection, then chased for 1 hr and protein synthesis and formation of assembly-intermediate particles were blocked by addition of cycloheximide (CH) for 1 hr. After removal of the drug, the cell culture was pulse labeled with [<sup>3</sup>H]valine for an additional 1 hr. Cell samples were withdrawn after the <sup>14</sup>C pulse (A), after the chase in the presence of cycloheximide (B), and after the <sup>3</sup>H-labeling (C). This double label and inhibition experiment is schematized in Fig. 1a. Virions and IM particles were isolated, disrupted with DOC, and analyzed on a glycerol gradient.

Figure 2 shows the profile of radioactivity in the different fractions of the particles, i.e., groups of nine hexons and apex components for both the mature virion and IM particle, and internal core for the virion. Since 60 to 80 min is required to form a mature virus particle (D'Halluin *et al.*, 1978b; Edvardsson *et al.*, 1976; Sundquist *et al.*, 1973), the [<sup>14</sup>C]valine label found in virions after a 60-min pulse was likely to represent proteins completing preformed particles. As shown in Fig. 2a and Table 1, only a small fraction of the label (less than 10%) was found in groups of nine hexons, and most of the newly incorporated proteins appeared in the vertex structures and nucleoprotein core. A similar pattern was obtained with the [<sup>3</sup>H]valine pulse,

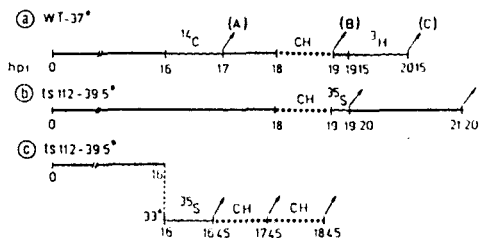


FIG. 1. Schematic drawing of pulse-chase labeling, cycloheximide-block, and temperature-shift experiments performed on WT (a) and H2 *ts* 112 mutants (b, c). The wavy lines indicate the periods of labeling. Dashed lines indicate the addition of cycloheximide (CH).

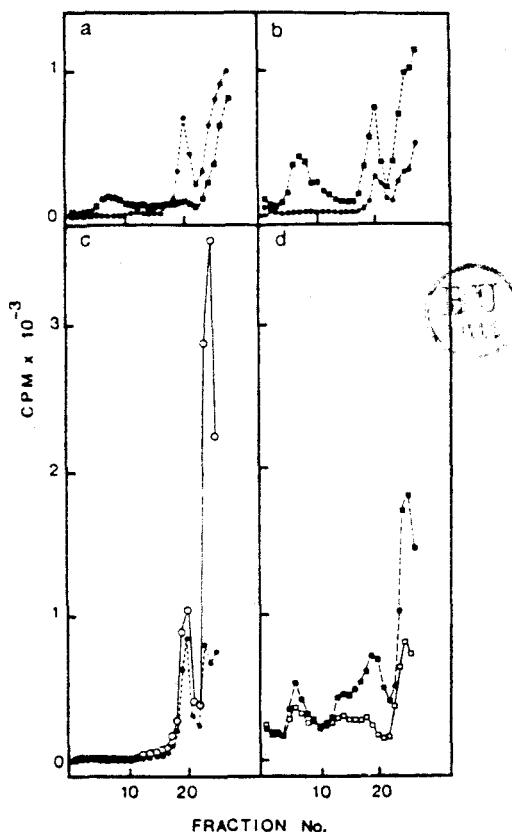


FIG. 2. Ultracentrifugation analysis in a 10-40% glycerol gradient of deoxycholate-disrupted WT virions and assembly-intermediate (IM) particles. Square symbols, virions; round symbols, IM. Solid symbols, <sup>14</sup>C label; open symbols, <sup>3</sup>H label. (a), Sample A of Fig. 1; (b), sample B; (c), doubly labeled IM particles of sample C; (d), doubly labeled virions of sample C. Fractions 5-8 corresponded to deoxyribonucleoprotein cores, fractions 18-21 to groups of nine hexons, and the top fractions 23-27 to apical components of the virus icosahedron.

performed after the CH block (Fig. 2d). After a 1-hr chase period in the presence of CH, which is known to block the formation of new intermediate particles, but not to impair the maturation of IM particles into virions (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976; Sundquist *et al.*, 1973), a significant amount of <sup>14</sup>C label was found in the groups of nine hexons (Fig. 2b). This was still visible after an additional 1-hr chase (Fig. 2d and Table 1).

Analysis of pulse-labeled assembly-in-

## SEQUENTIAL ENTRY OF PROTEINS INTO Ad2 PARTICLES

157

TABLE 1

LABELING FLOW ENTERING THE DIFFERENT TOPOLOGICAL FRACTIONS OF WT ADENOVIRUS PARTICLE  
IN PULSE-CHASE LABELING AND CYCLOHEXIMIDE-BLOCK EXPERIMENTS

Sample <sup>a</sup>	Radioactivity <sup>b</sup>			
	Core	Groups of nine hexons	Vertices	Total
(A): <sup>14</sup> C-IM	—	1,869 (34.4)	3,558 (65.5)	5,427
(A): <sup>14</sup> C-MV	583 (20.2)	263 (9.1)	2,040 (70.7)	2,886
(B): <sup>14</sup> C-IM	—	580 (30.0)	1,355 (70.0)	1,935
(B): <sup>14</sup> C-MV	1,770 (21.8)	2,102 (25.8)	4,239 (52.2)	8,111
(C): <sup>14</sup> C-IM	—	1,982 (42.5)	2,681 (57.4)	4,662
(C): <sup>3</sup> H-IM	—	2,746 (22.0)	9,757 (78.0)	12,503
(C): <sup>14</sup> C-MV	1,807 (15.7)	3,219 (28.0)	6,482 (56.4)	11,508
(C): <sup>3</sup> H-MV	1,328 (25.7)	1,236 (24.0)	2,600 (50.7)	5,164
Theoretical mass				
IM <sup>c</sup>	—	63,150 (58.7)	44,390 (41.3)	107,540
MV <sup>c</sup>	23,525 (21.0)	63,150 (46.4)	44,390 (32.6)	136,065



<sup>a</sup> The samples (A), (B), and (C) correspond to the labeling experiment schematized in Fig. 1a and depicted in Fig. 2. IM = assembly intermediate particles; MV = mature virions.

<sup>b</sup> Radioactive label was expressed as counts per minute. Figures in parentheses represented percentages of the total counts.

<sup>c</sup> The theoretical values for protein mass, expressed in kilodaltons, were based on the molecular weight of each unique virus polypeptide (Anderson *et al.*, 1973) and the number of polypeptide copies in the particle (Phillipson, 1979).

intermediate particles revealed a strong incorporation of label into the vertex structures (Fig. 2a), and this was still more evident in the [<sup>3</sup>H]valine pulse, performed after the CH block (Fig. 2c). Table 1 summarizes the gradient data. It was noteworthy that the amount of label in the vertex components of IM particles and virions greatly exceeded the theoretical value of the protein mass in this topological fraction of the virus particle.

With the restriction about capsid proteins VI and VIII as mentioned above, the results with the WT might be interpreted in at least three ways. (i) The [<sup>3</sup>H]valine-labeled IM populations might represent particles approaching completion, and in this case, their capsid would finish at their vertices; (ii) the <sup>3</sup>H-labeled particles corresponded to newly formed IM particles assembling after the CH-block release, which implied that the initiation of capsid assembly occurred at the future vertices; (iii) the vertices might be metabolically active zones of IM particles, in equilibrium with free, newly synthesized capsomers.

However, since a significant proportion of the IM particle population matured into virions during a 1-hr labeling, even in the presence of cycloheximide (D'Halluin *et al.*, 1978b), it appeared impossible to decide between these three hypotheses, without additional data obtained with mutants. The labeling pattern of proteins in the different virus particle fractions was next determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

#### *Polypeptide Labeling of Subviral Entities in WT Virions and Assembly-Intermediate Particles*

*Assembly-intermediate (IM) particles.* The IM particles pulse labeled with [<sup>14</sup>C]valine for 1 hr showed the expected pattern in groups of nine hexons (Fig. 3b), i.e., polypeptides II (hexon) and IX (Boulangier *et al.*, 1979). At the top of the gradient, where vertex components and DOC-released proteins sediment, <sup>14</sup>C label was found in bands II, III (penton base), IIIa, IV (fiber), precursors PVI and PVIII, and



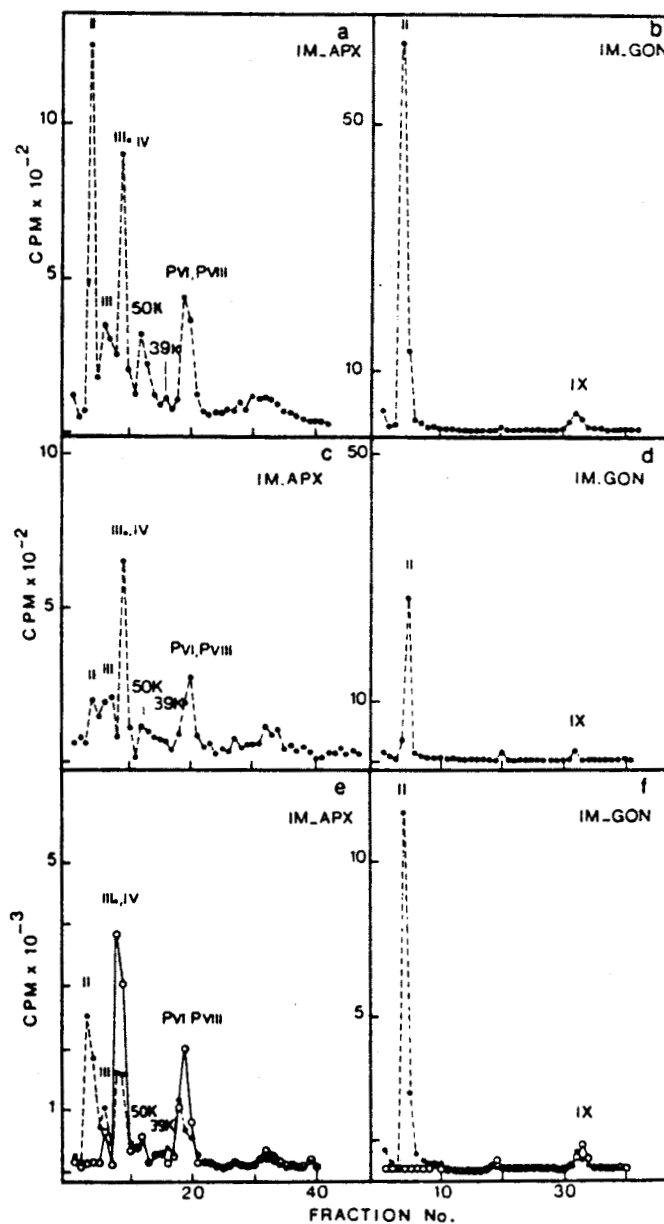


FIG. 3. Polypeptide composition of deoxycholate-disrupted IM particles of WT adenovirus. Groups of nine hexons (GON) and apical components (APX), isolated as depicted in Figs. 1 and 2 were analyzed in SDS-polyacrylamide slab gels. Gel slices (2 mm thick) were dissolved and radioactivity counted in a liquid scintillation spectrometer. (a, b), sample A of Fig. 1; (c, d), sample B, obtained after cycloheximide block; (e, f), sample C, doubly labeled with  $^{14}\text{C}$  +  $^3\text{H}$ . Note that the "new"  $^3\text{H}$  label was found mainly in the IIIa and PVI-PVIII zones.

in two additional species, 50K and 39K, previously reported (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976; Ishibashi and

Maizel, 1974; Sundquist *et al.*, 1973). The major labeled bands appeared to be II, III, IIIa, 50K, PVI, and PVIII (Fig. 3a). During

the chase in the presence of cycloheximide (CH), the labeling decreased in all polypeptides, but less drastically in IIIa, 50K, PVI, and PVIII (Fig. 3c). After release of the CH block, the "new" [<sup>3</sup>H]valine isotope, which superimposed the "old" <sup>14</sup>C label, mainly incorporated into IIIa, PVI, PVIII, in minor amounts in the III, 50K, and 39K species of the apex fraction (Fig. 3e), and in protein IX in the group of nine hexons (Fig. 3f). Since CH blocked the formation of new IM particles (D'Halluin *et al.*, 1978a), it seemed that the last proteins to enter the IM particles—or the most metabolically active components—were the major IIIa, PVI, and PVIII, and the minor 50K, 39K, and IX polypeptides.

*Mature virions.* The [<sup>14</sup>C]valine pulse mainly labeled proteins V and VII in the core, proteins II and IX in the groups of nine hexons, and proteins II, III, IIIa, IV, VI, and VIII in the apex fractions (Figs. 4a-c). Proteins IIIa and VI found in the top fraction showed a relatively high degree of labeling, compared with the polypeptide pattern of a control virion labeled between 20 and 30 hr after infection. This suggested that these proteins were "late" proteins in the assembly process. In the double label experiment, no detectable [<sup>3</sup>H]valine label was found in the virion apex, and only trace amounts were found in the precursor of core protein VII in the core fraction (Fig. 4i). <sup>3</sup>H-labeled core proteins V and PVII were detected in the gradient fractions corresponding to groups of nine hexons (Fig. 4h), which confirmed that young virions contained an immature nucleoprotein core, with an affinity of PVII (and possibly V) for DNA lower than that of cleaved VII (Weber, 1976; D'Halluin *et al.*, 1980). In all virion samples proteins IIIa and VI appeared among the most strongly labeled components (Figs. 4a, d, g). The results of pulse-chase labelings with cycloheximide inhibition therefore suggested that hexon and penton were the most ancient protein components of the capsid, and that the latest proteins to enter the particle were IIIa, PVI-VI, and PVIII-VIII in the apex and hexon shell, and V and PVII-VII in the core.

#### *Double Synchronization of Assembly-Intermediate Particle Formation in the H2 ts 112 Mutant*

The difficulty of interpreting the data obtained with the WT resided in the fact that IM particles evolved into virions during the pulse-chase labeling and that the IM population represented various stages of assembly and maturation. Cycloheximide inhibited the formation of new IM particles, but did not prevent their maturation (D'Halluin *et al.*, 1978a, b). Thus, the WT system appeared only synchronizable upstream with a CH block, but not downstream. The assembly-defective temperature-sensitive mutant H2 *ts* 112 (D'Halluin *et al.*, 1978b; Martin *et al.*, 1978) rendered possible a double synchronization of the IM particle formation: upstream, using a CH block, and downstream, by maintaining the cell culture at the non-permissive temperature; no maturation of IM particle occurred at 39.5° (Boudin *et al.*, 1980; D'Halluin *et al.*, 1978b). This experiment is schematized in Fig. 1b.

H2 *ts* 112-infected cells maintained at 39.5° were treated with CH for 1 hr at 18 hr after infection, to block the formation of new IM particles. CH was then removed, and the cells pulse labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 20 min at the same temperature. Cells were harvested just after the pulse and after 2 hr of chase at 39.5°. The period of labeling being short compared with the duration of the formation of IM particles (60 to 80 min), the IM particles isolated were incomplete and arrested in their formation by CH inhibition, and finished their assembly by using labeled material synthesized after CH removal. Polypeptide analysis of pulse-labeled IM particles revealed that the label was mainly localized in IIIa and 50K, both visible as doublets, in 39K, PVI, PVIII, and PVII, (Fig. 5, p). Labeled bands of hexon, 100K, penton base, 28K, 17K, and IX were detectable. After 2 hr of chase at 39.5°, the label still increased in IIIa and PVI-PVIII, and the lower band of the IIIa doublet disappeared; the 28K species became more visible (Fig. 5, c). The amount of label did

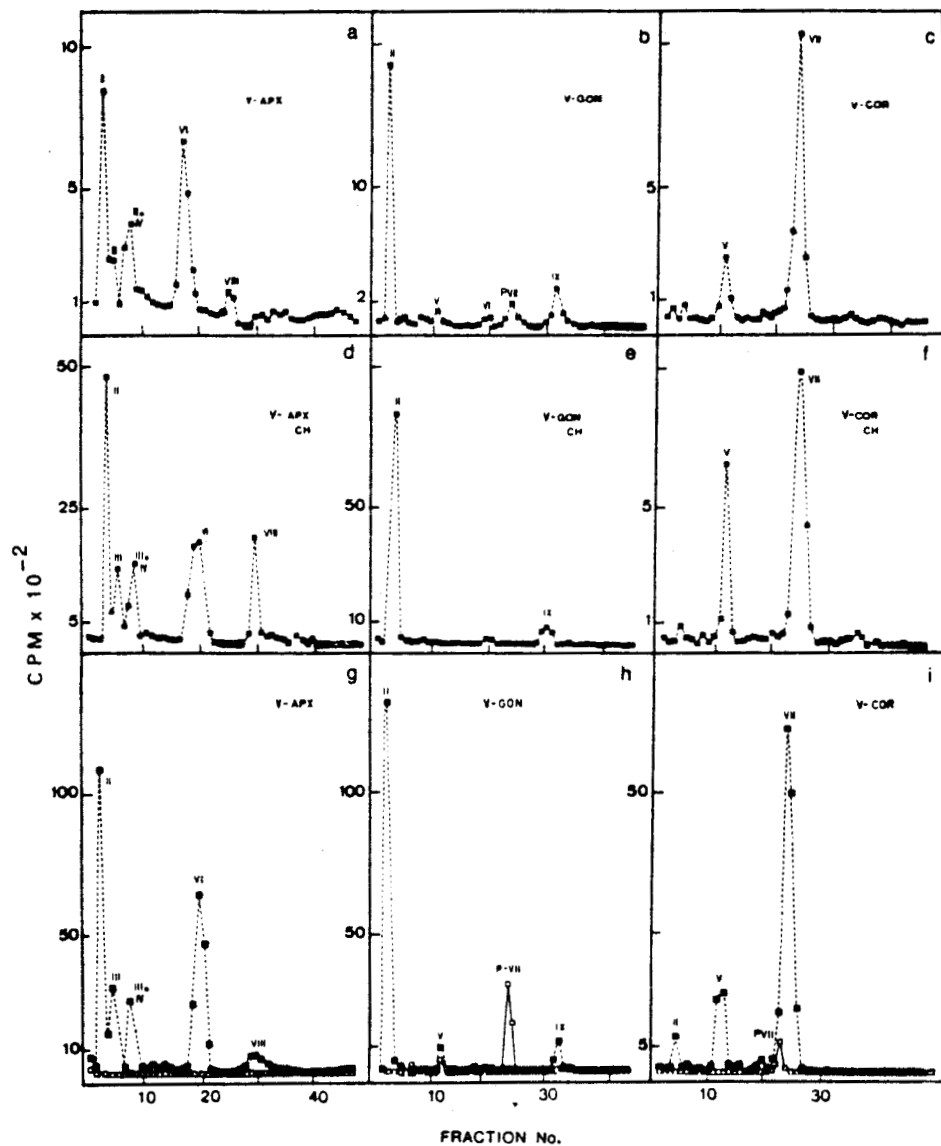


FIG. 4. Polypeptide composition of deoxycholate-disrupted WT virions. Viral cores (COR), groups of nine hexons (GON), and vertex components (APX), isolated as depicted in Figs. 1 and 2, were analyzed in SDS-polyacrylamide slab gels. (a, b, c), sample A of Fig. 1; (d, e, f), sample B; (g, h, i), sample C. Polypeptide VI appeared as one of the major components of the top of the gradient, where apical proteins and deoxycholate-released capsid proteins sediment. This stoichiometry was different from that observed for continuously labeled or stained virions (3). Note that <sup>3</sup>H label was found in trace amounts in PVII within the cores (i), and in V and PVII cosedimenting with groups of nine hexons (h).

not vary significantly during the chase period in hexon, penton base, PVII, and IX; the 50K sharpened in the upper band of

the doublet, and the amount of 39K and 17K slightly increased (Fig. 5, c).

These patterns strongly suggested that

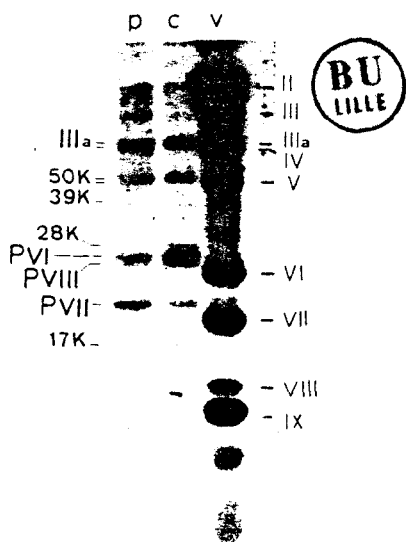


FIG. 5. Pulse-chase labeling of protein components of H2 *ts* 112 assembly-intermediate (IM) particles. Formation of new IM was blocked by addition of cycloheximide (CH) to an H2 *ts* 112-infected cell culture. The cells were pulse labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 20 min after release of the CH block and harvested just after the pulse (p) or chased for 2 hr at 39.5° (c). The IM particles were isolated in CsCl gradient and the polypeptides labeled in IM particles were analyzed in SDS-polyacrylamide gel. (v), Control adenovirion.

an early step of IM particle morphogenesis consisted of an assembly of hexons and pentons, along with 100K, 50K, 39K, PVII, and IX (the less radioactive and more stable bands), and that the incorporation of IIIa, 28K, and the pair PVI-PVIII occurred later. IIIa and 50K were rapidly converted, probably via phosphorylation (Boudin *et al.*, 1980; D'Halluin *et al.*, 1978a) to their higher-molecular-weight form after a 2-hr chase period (Fig. 5, c). This phosphorylation would therefore occur within the IM particles. The interpretation of the polypeptide labeling data was based on the assumption that proteins labeled last in IM particles were assembled or incorporated last. However, the hypothesis of an exchange of IM-incorporated proteins with soluble proteins must be considered. After the pulse labeling the cell cultures were

chased in the presence of a 10-fold excess of cold amino acid. In the hypothesis of some protein exchange, the label would decrease in certain bands. In fact, the label increased or was constant throughout a 2-hr chase period at 39.5° in all bands considered. This was still more evident in the following experiment performed with H2 *ts* 112 IM particles and virions.

#### *Evolution of Polypeptide Labeling in H2 ts 112 IM Particles and Virions during Temperature-Shift and Cycloheximide-Block Experiments*

HeLa cells infected with H2 *ts* 112 for 16 hr at 39.5° were transferred to the permissive temperature (33°) and pulse labeled for 45 min (i.e., a period equivalent to 15 min at 39.5°) after the shift-down. Cycloheximide was added just after the pulse, in order to block the formation of new IM particles, and maintained during the chase at 33°. Aliquots of cell culture were withdrawn at 0, 1, and 2 hr of chase and IM particles and virions isolated and analyzed in SDS polyacrylamide gels (Fig. 1c).

As shown in Fig. 6, lane b, the most intensively labeled bands in IM particles after the pulse were IIIa and a doublet in the 50K zone, suggesting the existence of different degrees of phosphorylation for the 50K species (D'Halluin *et al.*, 1978a; Persson *et al.*, 1979; Weber and Khittoo, 1983). PVI-PVIII and PVII were also significantly labeled. Traces of hexon (II), penton base (III), 56K, 39K, and 28K were visible. After a 1-hr chase (Fig. 6, lane d), the label still increased in the major bands IIIa, 50K doublet, PVI-VIII, PVII, and in the minor bands at 56K, 39K, and 28K, II, and III. The label decreased in all bands after 2 hr of chase in the presence of CH (Fig. 6, lane f).

In the virion, the major bands observed at the time of the pulse were III, IIIa, and 50K (Fig. 6, lane a). After 1 hr of chase in the presence of CH (Fig. 6, lane c) the most heavily labeled bands were IIIa, 50K, PVI-PVIII, and PVII. After 2 hr of chase at 33° with CH, IIIa, PVI-PVIII, and PVII remained the major labeled protein species;

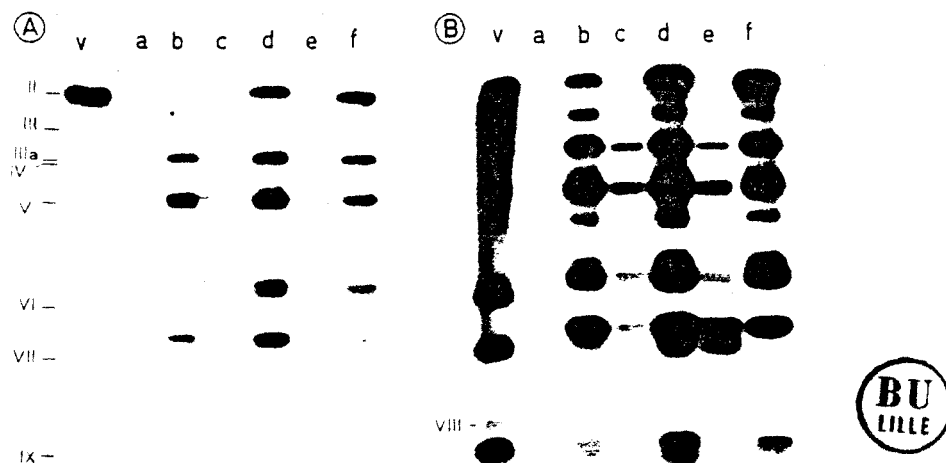


FIG. 6. Evolution of polypeptide labeling during maturation of H2 *ts* 112 IM particles at 33°. H2 *ts* 112-infected cells at 39.5° were shifted down to 33° and labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 45 min at this temperature. Cycloheximide was added at the end of the labeling period to block the formation of new IM particles and maintained during the chase period at 33°. The experiment is schematized in Fig. 1c. Cell samples were withdrawn at 0 hr, lanes a and b; 1 hr, lanes c and d; and 2 hr, lanes e and f of chase at 33° and virion and IM particles were isolated and analyzed on SDS-polyacrylamide gels. Lanes a, c, and e, virions banding at a density of 1.345; lanes b, d, and f, IM particles of 1.295-1.300 in density. (B) Represents a prolonged exposure of gel A. (v), Control adenovirion.

50K was replaced by a 48.5K species corresponding to core protein V, and PVII was partially converted to VII (Fig. 6, lane e). In contrast to the labeling pattern, the stained gel showed that hexon and penton were the two major components of IM particles and virions (not shown). This excluded the hypothesis that the labeled bands in the IM particles could correspond to aggregates of proteins constituting precoces or preassembly edifices lacking hexons and pentons.

The presence of PVII in the IM particles has been previously observed (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976; Persson *et al.*, 1979). The possibility that PVII was bound to DNA fragments, or core-like structures cosedimenting with IM particles was examined by treating IM samples with deoxyribonuclease I (50  $\mu$ g/ml, 1 hr at room temperature) and rebanding in a CsCl gradient. The PVII band was still present in the IM particle fraction, which seemed to rule out an artifact of preparation (not shown). The finding of

particles cosedimenting with mature or young virions ( $\rho$ : 1.345), containing un-cleaved PVII, PVI, PVIII, and the phosphoprotein 50K, but lacking the core protein V (Fig. 6, lane c) suggested that exchange of proteins or postsynthetic modifications occurred in the 50K-V zone, at the time of cleavage of PVII into VII (Fig. 6, lane e). This latter processing slightly preceded that of PVI and PVIII.

#### *Assembly of H2 ts 107 Particles upon Shift-Down to Permissive Temperature*

H2 *ts* 107 has been characterized as an assembly-defective mutant which fails to assemble virions and IM particles at the restrictive temperature (Martin *et al.*, 1978). It might therefore represent a tool for detecting early steps in assembly when shifted down to permissive temperature. KB cells in suspension were infected with H2 *ts* 107 and pulse labeled with [<sup>35</sup>S]methionine at 16 hr after infection at 39.5°. The culture was then transferred to 33° and maintained for 3 hr at this tem-

## SEQUENTIAL ENTRY OF PROTEINS INTO Ad2 PARTICLES

163

perature. Virions and IM particles were isolated in a CsCl gradient and analyzed. The labeling pattern of IM particles, banding at a density of 1.29-1.30, resembled that of H2 *ts* 112 IM particles (D'Halluin *et al.*, 1978b), and the polypeptide composition of H2 *ts* 107 virions was that of young, immature virions (D'Halluin *et al.*, 1978b; Ishibashi and Maizel, 1974), with an incomplete cleavage of PVII-VII (not shown). This confirmed the results previously obtained in temperature-shift experiments with the assembly-defective H2 *ts* 112: the virus material accumulated at the restrictive temperature assembled very rapidly upon shift-down, resulting in a masking of transient intermediate steps in assembly (D'Halluin *et al.*, 1978b). Electron microscopic examinations of H2 *ts* 107 IM samples revealed particles rounder and less polyhedral in shape than mature adenovirion, and reminiscent of those accumulated by H2 *ts* 112 (D'Halluin *et al.*, 1978b). Hexon capsomers appeared less regularly arranged than those of typical icosahedron. Irradiating fibers were occasionally visible (not shown).

*Evolution of H2 ts 107 Particles upon Shift-Up to the Restrictive Temperature*

Since cellular metabolism is slowed down at 33°, it seemed rewarding to study the kinetics of appearance of the different classes of IM particles formed by H2 *ts* 107

at 33°, as well as their polypeptide composition and development on shift-up: 33° would permit the detection of very transient steps in assembly, and the transfer to 39° would block the formation of new IM particles and reveal the possible passage from one class of particles to another. KB cells were infected with H2 *ts* 107 at 33°, and pulse labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 3 hr at 48 hr after infection. The label was chased for 2 hr at 33°, and the cultures were then transferred to 39.5°, and maintained at this latter temperature for 1 and 3.5 hr. The different classes of particles were analyzed in preformed CsCl gradients. Two bands of IM particles were found at densities of, respectively, 1.285 and 1.295, and a virion band at 1.345. Table 2 shows that label was constant throughout the chase period at 39.5°, indicating that no additional IM particles were assembled at this temperature. The label increased progressively in the virion band, and decreased significantly in 1.285 IM. The decrease was less pronounced in the 1.295-IM species. This suggested that the IM particles formed by H2 *ts* 107 at 33° were capable of maturation at the nonpermissive temperature. Prolonged periods of chase revealed that H2 *ts* 107 virions banding at 1.345 were stable up to 15 hr at 39.5° (not shown).

The polypeptide composition of the particles banding at the respective densities of 1.285, 1.295, and 1.345, is shown in Fig.

TABLE 2  
KINETICS OF LABELING OF THE DIFFERENT CLASSES OF PREVIRAL AND VIRAL PARTICLES  
PRODUCED BY H2 *ts* 107<sup>a</sup>

Chase period (temperature)	Particles banding at density			Total counts
	1.345	1.295	1.285	
2 hr (33°)	166 (8.2)	543 (27.1)	1296 (64.6)	2005
2 hr (33°) + 1 hr (39.5°)	849 (16.2)	1557 (29.7)	2834 (54.0)	5240
2 hr (33°) + 3.5 hr (39.5°)	2245 (41.9)	1186 (22.1)	1924 (35.9)	5355

<sup>a</sup> H2 *ts* 107-infected cells were pulse labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 2 hr at 33°, and chased at 33° for 2 hr. The culture was then transferred to 39.5° and chased at the restrictive temperature for different periods of time. Mature virions and assembly-intermediate particles were isolated in preformed CsCl gradient. Results were given as counts per minute. Figures in parentheses represented percentages of the total label.

7. The 1.345-particle pattern resembled that of young virions with partial cleavage of precursors to proteins VI, VIII, and VII (Fig. 7A, lane d). The 1.285-IM particles contained five major bands corresponding to hexon (II), a 90K band, penton base (III), PVIII, and PVII. Significant amounts of IIIa and 50K were visible (Fig. 7A, lane c). The 1.295-IM particles contained four major additional polypeptide species: IIIa, 50K, 28K, PVI (Fig. 7A, lane a). Since pulse-chase labeling kinetics of H2 *ts* 112 IM particles suggested that IIIa, 50K, and the pair of 28K-PVI, were proteins entering the capsid later on (Figs. 5 and 6), this supported the hypothesis that 1.285 IM precedes the 1.295-IM particle in the assembly pathway. This suggested a sequence of events in the sense 1.285 IM  $\rightarrow$  1.295

IM  $\rightarrow$  1.345 virion. Preliminary genetic mapping and biochemical analyses of H2 *ts* 107 indicated that its mutation lies in the 100K gene (to be published). The 90K polypeptide which was also found in H2 *ts* 107-infected cells at 39.5° (Fig. 7B) might be related to the virus-coded 100K; the 90K might represent a breakdown product of the 100K, or a 100K with an aberrant mobility on SDS-gels. The finding of a 100K-95K doublet coprecipitating with an anti-hexon monoclonal antibody also suggested a relationship between the 100K protein and protein species in the 95K-90K range (Cepko *et al.*, 1981).

#### DISCUSSION

The early steps in virus assembly were explored by pulse-chase labeling and cy-

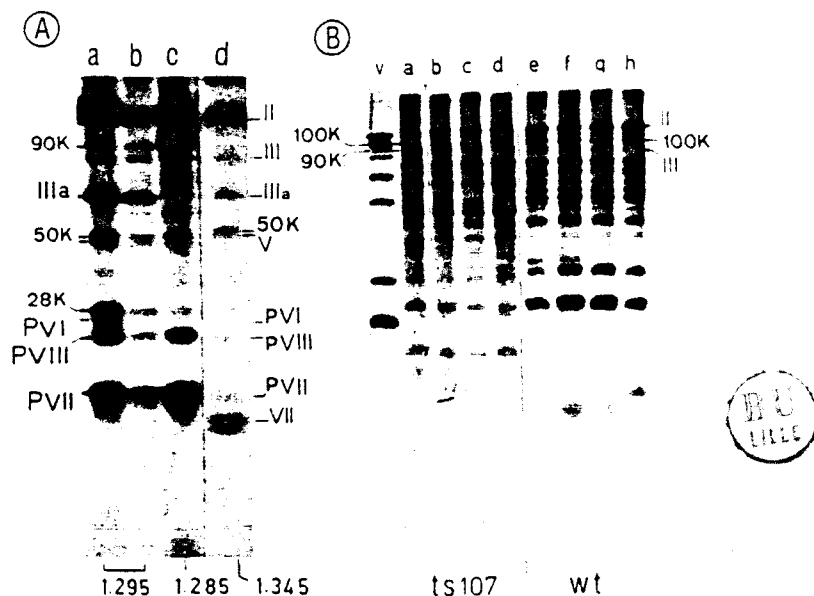


FIG. 7. Polypeptide analysis of H2 *ts* 107 IM particles and H2 *ts* 107-infected cells. (A) KB cells infected with H2 *ts* 107 at 33°, were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 2 hr at 48 hr after infection. The label was chased for 2 hr at 33°, and for an additional 3.5 hr at 39.5°. The different classes of H2 *ts* 107 particles were isolated in CsCl gradient and analyzed in SDS-polyacrylamide gel. Lanes a and b, IM particles banding at 1.295; lane c, IM particles banding at 1.285; lane d, particles banding at 1.345. The polypeptide pattern of 1.345 particles resembled that of WT young virions, with incomplete processing of precursors to VI, VIII, and VII. (B), Labeled polypeptides in H2 *ts* 107-infected cells. Infected-cell cultures maintained at 39.5° were pulse labeled for 1 hr at 17 hr after infection, and cell samples harvested after 0 hr (lanes a and e), 2 hr (lanes b and f), 6 hr (lanes c and g) and 22 hr (lanes d and h) of chase at 39.5°. Lanes a-d, H2 *ts* 107-infected cells; lanes e-h, WT-infected cells; (v), control virion. Note the presence of a 90K band under the virus-coded 100K in the mutant-infected cells.

cloheximide inhibition of assembly of previral particles. A double-synchronized system was used: upstream, cycloheximide blocked the formation of new assembly intermediate (IM) particles (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976; Sundquist *et al.*, 1973); downstream, the nonpermissive temperature (39.5°) prevented the maturation of preformed IM particles produced by the assembly-defective mutant H2 *ts* 112 (D'Halluin *et al.*, 1978b). Another assembly-defective *ts* mutant, H2 *ts* 107 (Martin *et al.*, 1978) was used in temperature-shift and pulse-labeling experiments to characterize the earliest steps in assembly. The data obtained here provided new information on the sequence of entry of proteins into the adenovirus particle. They suggest that an early step in assembly consisted in an association of the major structural proteins hexons and pentons, and minor IX to form a virus shell, with the contribution of the virus-coded 100K, and also PVIII and PVII. This step appeared to be temperature-sensitive in H2 *ts* 107, and to be the target for the inhibitor cycloheximide (D'Halluin *et al.*, 1978b). Several lines of evidence supported the hypothesis that the 100K plays a role as a scaffolding protein for the assembly-intermediate particles. (i) The occurrence of 100K within the cell nucleus late in infection strongly suggested that the role of the 100K was not limited to that of a partner protein required for hexon trimerization (Cepko and Sharp, 1982; Gambke and Depert, 1981a, b, 1983; Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1980, 1981); (ii) 100K was present within assembly-intermediate particles of WT (D'Halluin *et al.*, 1978a; Edvardsson *et al.*, 1976) and of assembly-defective mutants (D'Halluin *et al.*, 1978b; Edvardsson *et al.*, 1978); (iii) no IM particles were assembled at the restrictive temperature in the H2 *ts* 107, an 100K-defective temperature-sensitive mutant which produced normal amounts of hexon trimers (to be published). PVIII and PVII also behaved as scaffolding proteins, since they were found as virus-incorporated components very early in the assembly process (Fig. 7A).

A somewhat surprising result was the finding of large amounts of PVII within H2 *ts* 112 and H2 *ts* 107-IM particles lacking DNA, an observation previously reported in WT (D'Halluin *et al.*, 1978a, b; Edvardsson *et al.*, 1976). Another unexpected finding was the presence of virus particles banding at 1.345 and containing a full-length genome, unprocessed PVII, protein 50K, but lacking core protein V (Fig. 6, lanes c, e). This might be explained if 50K is a phosphorylated form of core protein V, dephosphorylated upon virus maturation, as recently suggested (Weber and Khittoo, 1983). Some protein exchange and/or modifications would therefore occur in the 50K-V species late in the assembly pathway, simultaneous with the cleavage of PVII-VII. Data shown in Fig. 6, lane e also suggested that processing of PVII preceded the other maturation cleavages (PVI-PVIII). The presence of PVII in IM particles, preceding the entry of viral DNA (Fig. 6, lanes b, d), did not exclude the possibility that additional molecules of PVII entered the capsid after (or during) DNA encapsidation. However, the results of double-labeling experiments suggested that this proportion was low (Fig. 4).

The sequence of events in the adenovirus morphogenetic pathway and the entry of viral proteins into assembly-intermediate particles may be summarized as follows. (i) Hexons, pentons, protein IX, scaffolding protein 100K, PVIII, and PVII assembled to form a previral particle banding at a density of 1.285. (ii) Additional incorporation of stabilizing and/or maturation proteins IIIa, 50K (identified as a phosphorylated form of V; Weber and Khittoo, 1983), 39K, 28K, and PVI (a protein with a high affinity for adenovirus double-stranded DNA; Russell and Precious, 1982) resulted in the formation of 1.295 IM; this class of IM particles has been found to be accumulated in H2 *ts* 112 at the nonpermissive temperature (D'Halluin *et al.*, 1978a, b). They band at 1.295-1.300 in a nonfixed state, and at 1.310-1.315 after reversible fixation with a cleavable di-imidoester (D'Halluin *et al.*, 1978a, b). The fixation probably resulted in some shrinkage



of the particles. (iii) The exit of 100K, 39K, and 28K occurred upon entry of viral DNA, leading to 1.370-IM particles (D'Halluin *et al.*, 1978a). (iv) The dephosphorylation or exit of 50K and its replacement by an unphosphorylated core protein V (Weber and Khittoo, 1983), and the processing of precursors to VII, VI, VIII, and DNA-terminal protein, gave rise to mature, infectious 1.345 virions. The assembly-defective mutant H2 *ts* 107 therefore revealed a new step in the assembly pathway of human adenovirus, occurring earlier in the sequence than the assembly-intermediate particles accumulated by H2 *ts* 112. The polypeptide composition of the H2 *ts* 107 IM particles suggested that 100K, PVIII, and also PVII were involved at early stages of capsid assembly, probably as scaffolding components.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U.233), the Centre National de la Recherche Scientifique (ERA 225), and the Faculté de Médecine de Lille (UER III). We are indebted to Pierre Lemay who was the promotor of this work. We thank Didier Petite for providing us with cell cultures, Chantal Cousin for mutant stocks, Jean-Claude D'Halluin for fruitful discussions, and Virginie Milleville for secretarial aid. We thank Raymond Pierce for critical reading of the manuscript and Claude Vandepierre for illustrations.

#### REFERENCES

- ANDERSON, C. W., BAUM, P. R., and GESTELAND, R. F. (1973). Processing of adenovirus 2 induced proteins. *J. Virol.* 12, 241-252.
- BOUDIN, M. L., D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1980). Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation. *Virology* 101, 144-156.
- BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G. E., and RUSSELL, W. C. (1979). Characterization of adenovirus protein IX. *J. Gen. Virol.* 41, 783-800.
- CEPKO, C. L., CHANGELIAN, P. S., and SHARP, P. (1981). Immunoprecipitation with two-dimensional pools as a hybridoma screening technique: Production and characterization of monoclonal antibodies against adenovirus 2 proteins. *Virology* 110, 385-401.
- CEPKO, C. L., and SHARP, P. (1982). Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a nonvirion protein. *Cell* 31, 407-415.
- D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1981). Mapping of adenovirus type 2 temperature-sensitive mutations by restriction endonuclease analysis of interserotypic recombinants. *J. Virol.* 41, 401-413.
- D'HALLUIN, J. C., MARTIN, G. R., TORPIER, G., and BOULANGER, P. (1978a). Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. *J. Virol.* 26, 357-363.
- D'HALLUIN, J. C., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P. (1980). Effects of novobiocin on adenovirus DNA synthesis and encapsidation. *Nucleic Acids Res.* 8, 1625-1641.
- D'HALLUIN, J. C., MILLEVILLE, M., BOULANGER, P. A., and MARTIN, G. R. (1978b). Temperature sensitive mutant of adenovirus type 2 blocked in virion assembly: Accumulation of light intermediate particles. *J. Virol.* 26, 344-356.
- D'HALLUIN, J. C., MILLEVILLE, M., MARTIN, G. R., and BOULANGER, P. (1980). Morphogenesis of human adenovirus type 2 studied with fiber- and fiber and penton base-defective temperature-sensitive mutants. *J. Virol.* 33, 88-99.
- EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JÖRNVALL, H., PRAGE, L., and PHILIPSON, L. (1976). Intermediates in adenovirus assembly. *J. Virol.* 19, 533-547.
- EDVARDSSON, B., USTACELEBI, S., WILLIAMS, J., and PHILIPSON, L. (1978). Assembly intermediates among adenovirus type 5 temperature sensitive mutants. *J. Virol.* 25, 641-651.
- EVERITT, E., LUTTER, L., and PHILIPSON, L. (1975). Structural proteins of adenoviruses. XII. Location and neighbor relationship among proteins of adenovirus type 2 as revealed by enzymatic iodination, immunoprecipitation, and chemical cross-linking. *Virology* 67, 197-208.
- FLINT, S. J., and SHARP, P. A. (1976). Adenovirus transcription. V. Quantitation of viral RNA sequences in adenovirus 2-infected and transformed cells. *J. Mol. Biol.* 106, 749-771.
- GAMBKE, C., and DEPERT, W. (1981a). Late nonstructural 100,000- and 33,000-dalton proteins of adenovirus type 2. I. Subcellular localization during the course of infection. *J. Virol.* 40, 585-593.
- GAMBKE, C., and DEPERT, W. (1981b). Late nonstructural 100,000- and 33,000-dalton proteins of adenovirus type 2. II. Immunological and protein chemical analysis. *J. Virol.* 40, 594-598.
- GAMBKE, C., and DEPERT, W. (1983). Specific complex of the late nonstructural 100,000 dalton protein with newly synthesized hexon in adenovirus type 2-infected cells. *Virology* 124, 1-12.
- GINSBERG, H. S. (1979). Adenovirus structural proteins. In "Comprehensive Virology," (H. Fraenkel-

## SEQUENTIAL ENTRY OF PROTEINS INTO Ad2 PARTICLES

167

- Conrat and R. R. Wagner, eds.), Vol. 13, pp. 409-457. Plenum, New York.
- ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J. V., JR. (1974). The polypeptides of adenovirus. V. Young virions, structural intermediates between top components and aged virions. *Virology* 57, 409-424.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- LEIBOWITZ, J., and HORWITZ, M. S. (1975). Synthesis and assembly of adenovirus polypeptides. III. Reversible inhibition of hexon assembly in adenovirus type 5 temperature-sensitive mutants. *Virology* 66, 10-24.
- LEWIS, J. B., ANDERSON, C. W., and ATKINS, J. F. (1977). Further mapping of late adenovirus genes by cell-free translation of RNA selected by hybridization of specific DNA fragments. *Cell* 12, 37-44.
- MARTIN, G. R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALUIN, J. C., and BOULANGER, P. A. (1978). Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants. *J. Gen. Virol.* 41, 303-314.
- OOSTEROM-DRAGON, E. A., and GINSBERG, H. S. (1980). Purification and preliminary immunological characterization of the type 5 adenovirus, nonstructural 100,000 dalton protein. *J. Virol.* 33, 1203-1207.
- OOSTEROM-DRAGON, E. A., and GINSBERG, H. S. (1981). Characterization of two temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus with mutations in the 100,000 dalton protein gene. *J. Virol.* 40, 491-500.
- PERSSON, H., MATHISEN, B., PHILIPSON, L., and PETERSSON, U. (1979). A maturation protein in adenovirus morphogenesis. *Virology* 93, 198-208.
- PHILIPSON, L. (1979). Adenovirus proteins and their messenger RNAs. *Adv. Virus Res.* 25, 357-405.
- RUSSELL, W. C., and BLAIR, G. E. (1977). Polypeptide phosphorylation in adenovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 34, 19-35.
- RUSSELL, W. C., and PRECIOUS, B. (1982). Nucleic acid-binding properties of adenovirus structural polypeptides. *J. Gen. Virol.* 63, 69-79.
- SUNDQUIST, B., EVERITT, E., PHILIPSON, L., and HÖGLUND, S. (1973). Assembly of adenoviruses. *J. Virol.* 11, 449-459.
- TOOZE, J. (1980). "DNA Tumour Viruses. Molecular Biology of Tumour Viruses," 2nd ed, Part 2, pp. 518-546. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- WEBER, J. (1976). Genetic analysis of adenovirus type 2. III. Temperature-sensitivity of processing of viral proteins. *J. Virol.* 17, 462-471.
- WEBER, J., and KHITTOO, G. (1983). The role of phosphorylation and core protein V in adenovirus assembly. *J. Gen. Virol.* 64, 2063-2068.

## Hexon Trimerization Occurring in an Assembly-Defective, 100K Temperature-Sensitive Mutant of Adenovirus 2

NATHALIE MORIN<sup>1</sup> AND PIERRE BOULANGER<sup>2</sup>

(U-233)

Laboratoire de Virologie Moléculaire de l'INSERM, Place de Verdun, 59045 Lille, France

Received January 15, 1985; accepted February 24, 1986

Analysis of 100K-defective temperature-sensitive adenovirus mutants confirmed the multifunctional character of the nonstructural, virus-coded 100K protein. In addition to its function in hexon trimerization (altered in H5ts1), and its possible direct or indirect role in hexon transport to nucleus (mutated in H2ts118), genetic and biochemical evidence was presented that 100K play some critical role in the scaffolding process of adenovirus capsid. This function appeared to be defective in H2ts107 and to map between coordinates 69.0 and 69.9, leftward from the H5ts1 lesion (70-73 map units; Arrand, 1978). This corresponded to the central domain of the 100K protein, between amino acid 300 and 400 from the N end. DNA sequencing of cloned fragments of H2ts107 DNA overlapping the mutation revealed two point mutations on the same codon at nucleotide 25,082 and 25,083 (GAC — GCA), corresponding to a nonconservative amino acid change (aspartic acid — alanine) at position 324 in the 100K sequence. 100K of adenovirus 2 wild type (WT) was found to bind in significant amounts to novobiocin-affinity column, and to be coeluted with hexon, penton, IIIa, and cellular topoisomerase II activity, by novobiocin- or ATP-Mg<sup>2+</sup>-containing buffers. H2ts107 100K also bound to novobiocin column, but the elution pattern differed from that of WT, suggesting some alteration in the affinity of the mutated 100K for novobiocin. The same behavior on affinity column as H2ts107 100K was observed for 90K, a cleavage product of the 100K, found in great abundance in H2ts107 at 39.5° and corresponding to the C-terminal moiety of the 100K molecule. This implied that the "novobiocin-binding" domain of the 100K was not confined at its N terminus, and was altered in the H2ts107 mutant. © 1986 Academic Press, Inc.

### INTRODUCTION

The virus-coded 100,000-Da protein of adenovirus has been termed "late non-structural," since it is synthesized in the same phase of the viral cycle as the structural capsid proteins of the virion (Anderson *et al.*, 1973) and it is not found in the mature virus particle (Ishibashi and Maisel, 1974; Edvardsson *et al.*, 1978; D'Halluin *et al.*, 1978). The fact that nearly 10% of the genome of human adenoviruses is devoted to the encoding of the 100K protein has intrigued many authors (Cepko and

Sharp, 1982, 1983; reviewed by Pettersson, 1984). From this theoretical consideration and from several lines of experimental evidence, it might be supposed that multiple functions are carried by the 100K protein.

A functional role in the transport of hexons to nucleus, and an involvement in the structure of mRNA protein complex and of nuclear matrix have been suggested on the basis of data obtained with temperature-sensitive mutants (Russell *et al.*, 1972; Kauffman and Ginsberg, 1976), and analysis of subcellular localization during the cell cycle (Sundquist *et al.*, 1977; Tasseront-De Jong *et al.*, 1979; Hodge *et al.*, 1977; Gambke and Deppert, 1981). However, the major function of the 100K appears to be the hexon trimerization (Cepko and Sharp, 1982; Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981). All 100K-defective temperature-

<sup>1</sup> Present address: Département de Microbiologie, Centre Hospitalier et Universitaire de Sherbrooke, Sherbrooke, J1H 5N4 Québec, Canada.

<sup>2</sup> Present address to which requests for reprints should be sent: Molecular Biology Institute, UCLA, Los Angeles, Calif. 90024.

Waksman Institute

Cornell University  
Box 759,  
Ithaca, N.Y.  
14854

sensitive mutants characterized thus far fail to assemble hexon trimers (the capsomeric form of hexons) at the nonpermissive temperature (Williams *et al.*, 1971; Ginsberg *et al.*, 1974; Leibowitz and Horwitz, 1975; Frost and Williams, 1978; Arrand, 1978; Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981; Cepko and Sharp, 1983). Nascent hexon polypeptides would thus trimerize upon interaction with cytoplasmic 100K oligomeric complex (Cepko and Sharp, 1982).

In the present study, we characterize an assembly-defective *ts* mutant of adenovirus type 2, H2ts107 (Martin *et al.*, 1978) which fails to assemble virus capsids (Morin and Boulanger, 1984), but normally forms hexon trimers at the nonpermissive temperature. H2ts107 was found to map in the gene encoding the 100K protein, confirming the scaffolding role in the strict sense (Casjens and King, 1975) of the nonviral 100K in capsid morphogenesis (Morin and Boulanger, 1984).

#### MATERIALS AND METHODS

*Cells and viruses.* HeLa cells (originally obtained from J. Williams, Carnegie-Mellon Institute), Ad5-transformed HEK cells, line 293 and Hep2 cells (both from J. Weber, Sherbrooke) were grown as monolayers in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% calf serum. KB suspension cells (from M. Green, St. Louis) were cultured in Joklik's modified F13 medium (GIBCO) supplemented with 5% horse serum. Ad2 and Ad5 stocks were produced in KB suspension cells and titered using fluorescent focus assay (D'Halluin *et al.*, 1978), or plaque assay (D'Halluin *et al.*, 1982). The wild-type (WT) of Ad2 was originally supplied by J. Williams, and Ad5WT by W. C. Russell (MRC, Mill Hill, London). Ad2 mutants H2ts107, H2ts118, and H2ts121 were selected in our laboratory (Martin *et al.*, 1978). H2ts118 and H2ts121, both phenotypically hexon-defective mutants, belonged to two complementation groups and were mapped in the gene for 100K and hexon, respectively (D'Halluin *et al.*, 1982). H2ts107 appeared to be defective in virion assembly (Martin *et al.*, 1978). The

temperature-sensitive mutant H5ts1 (100K-minus) was obtained from J. Weber, and H5ts125 (DNA negative) from W. C. Russell. Isolation and purification of mature virion and of assembly intermediate (IM) particles have been described elsewhere (Morin and Boulanger, 1984). Disruption of particles with deoxycholate (DOC) treatment and isolation of subviral entities (nucleoprotein cores, groups of nine hexons and vertex components) has been described in detail in previous studies (Boulanger *et al.*, 1979; Morin and Boulanger, 1984).

*Phenotypic characterization of ts mutants.* The mutant phenotype was determined by (i) two-dimensional immunoelectrophoretic analysis of viral antigens, (ii) polypeptide analysis of *ts*-infected cells subjected to pulse-chase labelings, and (iii) electron microscopy, centrifugation analysis, and polypeptide composition of particles produced at the nonpermissive temperature (Martin *et al.*, 1978).

*Genetic characterization.* Complementation tests between *ts* mutants were carried out on HeLa cells as previously described (Martin *et al.*, 1978). Virus yields were plaque titered on HeLa cells at 33°. Genetic mapping was performed by interserotypic recombination (D'Halluin *et al.*, 1982).

*Marker rescue of temperature-sensitive mutations.* Heterotypic marker rescue of H2ts107 mutation was carried out using cloned Ad5 DNA fragments overlapping the 100K gene, or Ad5 DNA fragments purified by agarose gel electrophoresis. Plasmid recombinant pVM 504, derived from pKH 47, contained the *Bam*HI-*Eco*RI fragment of Ad5 (59.5 to 75.9 map units). This viral fragment corresponded to the gene coding for the DNA-binding protein (DBP) 72K and flanking sequences, including the 100K gene, of which coding sequence has been positioned between 67.08 and 73.80 map units (Roberts *et al.*, 1984). The deleted derivative pVM508 was obtained by deletion of *Bst*EII fragment (spanning from 63.2 to 67.8 map units); the pVM509 by deleting the *Sma*I fragment between 65.9 and 75.8 map units (D'Halluin *et al.*, 1984). The pVM543 contained the Ad5

*Hind*III-*Eco*RI-fragment between 72.8 and 75.9; the pVM511 the region of Ad5 DNA between coordinates 63.6 and 65.9, and between 75.8 and 75.9; the pVM565 the regions 59.5-68.2 and 69.9-75.8 of Ad5 DNA. Other noncloned fragments of Ad5 DNA were used, as indicated in Table 4. H2ts107 DNA-terminal protein complex, purified by CsCl-guanidine equilibrium centrifugation (D'Halluin *et al.*, 1984) was coprecipitated on 293 cells at 39.5° with Ad5 DNA fragments or recombinant plasmids linearized with *Eco*RI prior to cotransfection, using the calcium phosphate technique (Arrand, 1978).

*Biochemical studies.* Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis was performed by the method of Laemmli (1970) in 17.5% acrylamide slab gels, with an acrylamide to bisacrylamide ratio of 50:0.235 (Morin and Boulanger, 1974). Assembly of hexon capsomer was determined by sedimentation through sucrose gradients followed by SDS-gel electrophoresis, as previously described (Lemay and Boulanger, 1980). Quantitation of hexon capsomeric form (12 S) and of hexon polypeptide units (3.5 S) was achieved by the scanning of gel autoradiograms, using a Vernon scanner. Peptide fingerprinting was carried out in 20% SDS-polyacrylamide slab gel (Cleveland *et al.*, 1977). *Staphylococcus aureus* V8 protease was used as proteolytic enzyme.

*Isotopes and radioactive labelings.* Infected cell polypeptides were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine (600-700 Ci/mmol, Amersham, U.K.) in a medium containing 2.5% of the concentration of methionine in normal medium, for periods of time ranging from 2 to 4 hr. Label was chased by replacing the medium by a normal medium prewarmed at the required temperature. Labeling of cells with [<sup>32</sup>P]phosphate was carried out by incubating infected HeLa monolayer cells with 100 μCi/ml carrier-free <sup>32</sup>P (NEN) in phosphate-free culture medium supplemented with 2% dialyzed calf serum, for 4 hr at 16 hr after infection. N-acetylated termini of viral proteins were labeled by incubating infected HeLa cells with 10 μCi/ml sodium acetate (CEA, Saclay) for 2 hr at 16 hr after infection. <sup>125</sup>I-

labeled *Staphylococcus*-protein A was purchased from Amersham.

*Antibodies and immunological analyses.* Proteins eluted electrophoretically from SDS-gels were used to raise antibody in rabbits (Gambke and Deppert, 1981). Two different rabbit anti-100K sera (referred to as anti-100K-N and anti-100K-W, respectively) and one anti-90K were obtained. Guinea pig anti-100K serum was obligingly provided by W. Deppert (University of Ulm) and monoclonal anti-100K (5H × 100-1) by W. C. Russell. Antisera against hexon, IIIa, penton base, and IX were prepared in rabbits (Boulanger *et al.*, 1979; Boudin *et al.*, 1980). Immunoprecipitations were carried out by the *S. aureus*-protein A method of Kessler (1975), as described in detail elsewhere (Boulanger *et al.*, 1979). Western blotting was accomplished according to the method described by Towbin *et al.* (1977), using rabbit anti-100K or anti-90K sera. Immune complexes were revealed on blots by peroxidase-conjugated sheep anti-rabbit IgG (Institut Pasteur, Paris) or by <sup>125</sup>I-labeled protein A (Amersham). Indirect immunofluorescence microscopy was performed with HeLa monolayer cells, using the double staining technique (Cepko and Sharp, 1983). Fluorescein-conjugated sheep anti-rabbit IgG was purchased from Cappel (Malvern, Pa.).

*Affinity chromatography on hexon-Sepharose gel.* Sepharose 4B gel (Pharmacia) was activated by cyanogen bromide and a solution of hexon capsomers (1.5 mg/ml), purified as previously described (Boulanger and Puvion, 1973), was reacted with an equal volume of activated gel (Arndt-Jovin *et al.*, 1975). About 15 mg of hexon was thus coupled to 10 ml Sepharose 4B. Two 3-ml aliquots of hexon-Sepharose gel were then taken. One was used directly for affinity chromatography and was referred to as native hexon column. The other one was heated at 100° for 5 min and was designated as SDS-denatured hexon column. The physical state of hexon protein in both cases was controlled by the ability of the columns to retain anti-hexon antibody. Rabbit antiserum (0.5 ml) against hexon capsomer, prepared as previously described (Boulanger and Puvion, 1973) was diluted

91

with an equal volume of HEKT buffer (25 mM HEPES, pH 6.8, 50 mM KCl, 2 mM EDTA, 10% ethylene glycol, 2 mM thioglycerol, 0.1 mM PMSF), and loaded on top of a 5-ml hexon-Sepharose column. The column was rinsed with (i) HEKT buffer, (ii) HEKT containing 0.8 M KCl, and (iii) 0.2 M glycine-HCl, pH 2.8, successively. Hexon antibodies were assayed by the ELISA technique, using hexon-coated plates (Engvall and Perlmann, 1971). In SDS-denatured hexon column chromatography, 72% of hexon antibody was found to elute in the void volume of the column with the starting buffer, 23% with 0.8 M KCl, and only 5% with glycine-HCl, pH 2.8. By contrast, 85% of specific antibody was found to be retained on native hexon column, and to be eluted with acidic glycine buffer and only 15% in the 0.8 M KCl fractions. This suggested that most of hexon antigen linked to Sepharose was still in its native conformation, and also that SDS-treated hexon was not completely denatured, or had partially renatured after SDS treatment, since it was capable of binding about 30% of specific antibody.

Both hexon-Sepharose columns, equilibrated in HEKT buffer, were loaded with aliquots from the same cell extract and eluted with the following buffers: (i) HEKT buffer; (ii) HEKT containing 0.2 M KCl; (iv) HEKT buffer with 0.8 M KCl; (v) HEKT containing 0.8 M KCl and 5 M urea.

*Novobiocin affinity column and topoisomerase assay.* Two grams of dried 6-aminohexanoyl-Sepharose (CH-Sepharose 4B, Pharmacia) was swollen and washed with 0.5 M NaCl, then mixed with 1 mmol of novobiocin dissolved in water acidified to pH 4.5 with acetic acid. This corresponded to a 25-fold molar excess of novobiocin over the theoretical fixation capacity of the resin. One milliliter of a solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC, 50 mg/ml in water adjusted to pH 4.5) was added to the Sepharose-novobiocin mixture and the coupling reaction was allowed to proceed overnight at room temperature with gentle shaking. The gel was thoroughly washed on a sintered glass filter with successive solutions of: 1.0 M NaCl (a), 1.0 M NaCl,

0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 (b), 1.0 M NaCl-0.05 M sodium formate, pH 4.0 (c), (b) again, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0 (d), then the equilibrating buffer (HEKT). As schematized in Fig. 1, the coupling reaction of novobiocin to CH-Sepharose involved esterification of the free 2'-hydroxyl group of the mannosyl residue of novobiocin by the carboxyl function of the arm of CH-Sepharose. This mode of coupling preserved the coumarinyl moiety of the inhibitor and left it more accessible than in novobiocin-epoxy-Sepharose gel (Staudenbauer and Orr, 1981). The following elution buffers were used: (i) equilibrating HEKT buffer, (ii) HEKT buffer containing 0.1 mg/ml novobiocin, (iii) HEKT with ATP (20 mM) and Mg acetate (25 mM), (iv) HEKT with 0.8 M KCl, (v) 4 M NaCl-2 M urea.

The topoisomerase II activity was assayed on plasmid pKH47 DNA as substrate. One arbitrary unit of topoisomerase II was defined as the quantity of enzyme which relaxed 50% of circular negatively supercoiled DNA in 10 min at 37°, under the following conditions: 10 µl of sample was incubated with 1.5 µg of plasmid DNA in 50 µl of 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0.1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM dithiothreitol, 1 mM ATP, 1 mM PMSF, 10% glycerol (buffer B), containing 25 µg of bovine serum albumin per milliliter. Analysis of DNA interconversions was performed by agarose electrophoresis (Colwill and Sheinin, 1983). The enzyme specific activity was calculated from the enzyme units and the number of

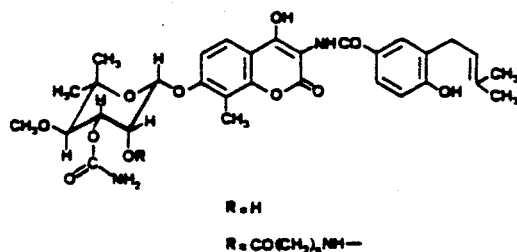


FIG. 1. Proposed mode of linkage of novobiocin to 6-aminohexanoyl agarose (CH-Sepharose 4B). The coupling involved covalent ester bond between 2'-hydroxyl group of the mannosyl moiety of novobiocin with the carboxyl group of the spacer arm. R = H: novobiocin; R = CO(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH-: 6-aminohexanoyl-Sepharose.

cpm of [ $^{35}\text{S}$ ]methionine present in the samples.

**Preparation of samples for affinity chromatography.** Ad2WT-, H2ts107-, and mock-infected KB suspension cells infected at 39.5° were labeled with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine for 2 hr at 16 hr after infection. The cells were pelleted and cell pellet was resuspended in an equal volume of 10 mM Tris-HCl, pH 7.8. After standing on ice for 30 min, the cell lysate was sonicated (3 bursts of 5 sec each with a Branson microtip), mixed with half a volume of 5 M NaCl (final molarity 1.7 M) and sonicated again. After centrifugation at 10,000 *g* for 30 min, the sample was dialyzed against the equilibrating buffer (HEKT) containing 20% glycerol, and centrifuged again before chromatography on hexon or novobiocin affinity gels. Loaded on column was usually 40–50  $\times 10^6$  cpm.

**In vitro labeling of novobiocin.** Novobiocin (Boehringer-Mannheim) was labeled by *O*-acetylation of the sugar residue of the molecule. One hundred micromoles of novobiocin (63.4 mg) in 0.5 ml pyridine was reacted with 1 mg of [ $^{14}\text{C}$ ]acetic anhydride (ca. 10  $\mu\text{mol}$ , 269  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ , 27.7 mCi/mmol; Amersham) for 16 hr at room temperature. [ $^{14}\text{C}$ ]-Acetylated novobiocin was separated from pyridinium [ $^{14}\text{C}$ ]acetate by preparative thin-layer chromatography on silica gel in solvent *n*-butanol:glacial acetic acid: water (50:15:25). The yellow fluorescent spots of [ $^{14}\text{C}$ ]-labeled novobiocin, easily recognizable from the blue spots of pyridinium acetate, were scratched off the glass plate under uv light and eluted with the chromatographic solvent. The eluate was then lyophilized. The specific activity ranged between 40,000 and 50,000 cpm/mg of novobiocin. [ $^{14}\text{C}$ ]Novobiocin powder was dissolved in the gel overlay buffer, pH 7.5, and used for probing adenovirus proteins.

**Affinity labeling of adenovirus polypeptides with [ $^{14}\text{C}$ ]novobiocin.** Detection of novobiocin-binding adenovirus proteins was performed after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of cold adenovirus WT and H2ts107 IM particles, using [ $^{14}\text{C}$ ]novobiocin as a probe and the gel overlay technique developed by Otto (1983). Gel overlay buffer: 20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM NaCl,

1 mM EGTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 1% NP-40, 0.5% bovine serum albumin, 0.25% gelatin. Each acrylamide gel was incubated with  $1 \times 10^6$  cpm of labeled novobiocin.

**DNA cloning and sequencing.** *Bgl*II-D fragment of H2ts107 DNA (nucleotide 23,086 to 28,174; 64.2 to 78.4 map units) was cloned in *Bam*HI site of pBR322. For DNA sequencing, the recombinant plasmid was digested with *Xho*I and *Sac*I, yielding a fragment corresponding to nucleotide 23,924–25,255 (66.5–70.3 map units). This fragment was then cleaved by *Sau*3A, which generated four fragments, one of 680, one of 287, and two of 180 bp. The two internal fragments were cloned in the *Bam*HI site of M13 mp18 and M13 mp19 (Eggerding and Pierce, 1983). The *Sac*I-*Sau*3A fragment was inserted between the *Sst*I and *Bam*HI sites of M13 mp18 and M13 mp19, and the *Sau*3A-*Xho*I fragment between the *Bam*HI and *Sal*I sites. The four fragments were sequenced using a commercially available M13 sequencing kit (Amersham). DNA polymerase Klenow fragment and [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]dATP were purchased from Amersham.

## RESULTS

**Phenotype of H2ts107.** H2ts107 produced excess amounts of capsid proteins, hexon, penton base, penton, and fiber at both permissive and nonpermissive temperatures, as did WT at 37°. However, the two-dimensional patterns of soluble antigens at 39.5 and 33° differed in the stoichiometry of antigens. Compared to hexon and fiber (peaks 1 and 5, respectively; Figs. 2a, b), the vertex components IIIa (peak 4) and penton (peak 3) appeared as accumulated at 39.5° (Fig. 2). This favored the hypothesis of an assembly-defective *ts* mutant. H2ts107 failed to assemble any viral or previral particle at 39.5° (Martin *et al.*, 1978; Morin and Boulanger, 1984). The capsid components accumulated at the nonpermissive temperature readily assembled to form assembly intermediate particles (or intermediate of maturation:IM) and mature virions upon shift-down to 33° (Morin and Boulanger, 1984).

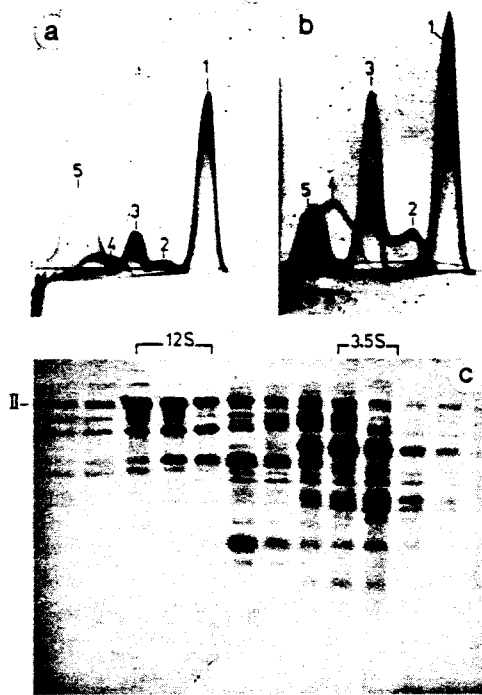


FIG. 2. Phenotypic characterization of H2ts107. Two-dimensional immunoelectrophoresis of H2ts107 soluble antigens synthesized at 33° (a), and at 39.5° (b). The immune precipitate peaks correspond to 1, hexon; 2, penton base; 3, penton; 4, protein IIIa; 5, fiber (Boudin *et al.*, 1980). Centrifugation analysis in sucrose density gradient of H2ts107 capsomers formed at 39.5° (c). H2ts107-infected cells were labeled with [<sup>35</sup>S]-methionine for 2 hr at 18 hr after infection, and cell extracts were analyzed by velocity gradient centrifugation. The polypeptide composition of each gradient fraction was determined by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Hexon capsomers (the trimeric form) sediment at 12 S, the hexon polypeptide subunit (polypeptide II) at 3.5 S. (a), (b): Coomassie blue staining; (c): autoradiogram.

Electrophoretic migration and immunological reactivity of H2ts107 hexon capsomers, but also their behavior in velocity gradient sedimentation, appeared normal at the nonpermissive temperature. H2ts107 trimerized the hexon polypeptide units (3.5 S) into functional capsomeric form of hexon (12 S) with the same efficiency as WT: after a 2-hr labeling period, 75-80% of the hexon material was found in the form of capsomeric hexons (Fig. 2c, Table 1).

Similar centrifugation analysis of members of two complementation groups of phenotypically hexon mutants yielded different sets of data. In H2ts121, mutated in the hexon gene (D'Halluin *et al.*, 1982), low amounts of label were found in both hexon polypeptide and hexon capsomer zones, but the trimerization rate was comparable with that of WT (76%, Table 1). H2ts118 has been mapped in the 100K gene (D'Halluin *et al.*, 1982), as H5ts1 (Frost and Williams, 1978; Arrand, 1978). H2ts118 assembled hexon trimers normally (Table 1), but these hexons were unstable and degraded during the chase period at 39.5° (Martin *et al.*, 1978; D'Halluin *et al.*, 1982). H5ts1 failed to assemble hexon trimers, and most of the hexon label remained in the 3.5 S zone of the gradient (Table 1), a result expected from previous studies (Cepko and Sharp, 1983). H2ts107 was therefore phenotypically characterized as an assembly-defective temperature-sensitive mutant, with a normal hexon phenotype.



TABLE 1

OCCURRENCE OF HEXON TRIMERS IN ADENOVIRUS 2 WT AND 100K-DEFECTIVE *ts* MUTANTS AT 39°\*

Virus	Gradient zone <sup>b</sup> (%)	
	12 S	3.5 S
H2 WT	5164 (85.8)	850 (14.2)
H2ts107	3350 (75.8)	1067 (24.2)
H2ts118	5407 (78.9)	1440 (21.1)
H5ts1	1640 (21.8)	5880 (78.2)
H2ts121	442 (76.0)	140 (24.0)

\* HeLa cell monolayers infected with WT or *ts* mutants at 10 FFU/cell and 39.5° were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 2 hr at 18 hr after infection. Infected cell extracts were centrifuged in sucrose gradients as previously described and gradient fractions analyzed in SDS-gels (Lemay and Boulanger, 1980).

<sup>b</sup> The components sedimenting at 12 S correspond to the capsomeric form of hexon (hexon trimers), the 3.5 S components to hexon polypeptide units (Lemay and Boulanger, 1980). Figures in the Table represent the amount of label found in the hexon polypeptide bands of both 12 S and 3.5 S zones, as determined by scanning of gel autoradiograms (arbitrary units of peak surface). Figures in parentheses are percentages of radioactive label in 12 S hexon capsomers and 3.5 S hexon subunits.

A 92 99 + 32, 34, 32.

V4 2192

6

B



**Complementation.** Complementation tests were carried out between H2ts107 and other mutants of serotypes 2 and 5 with temperature-sensitive lesions in the gene for the 100K protein, viz., H2ts118 and H5ts1. As control, the degree of complementation was also determined with the hexon-minus mutant H2ts121, and the DNA-negative H5ts125. The results are summarized in Table 2. Complementation occurred between H2ts107 and both H2ts121 (complementation index, CI of 70), and H5ts125 (CI of 130). There was no apparent complementation between H2ts107 and either H5ts1 or H2ts118, suggesting that the same gene product was affected in these three mutants. Since both H5ts1 and H2ts118 have been mapped in the 100,000-Da protein gene, H2ts107 would be mutated in the gene coding for the 100K protein. The genetic and biochemical data reported below supported this hypothesis.

**Analysis of ts+ interserotypic recombinants.** HeLa cells were doubly infected with 5 PFU each of H2ts107 and H5ts1 and maintained at 33° for 96 hr. The total virus yield and the yield of ts+ recombinant viruses were measured by plaque titration on HeLa monolayer cells at 33 and 39.5°, respectively. Fifty plaques were isolated at 39.5° and tested for plaquing efficiency at both temperatures. The recombination frequency between H2ts107 and H5ts1 was

found to range between 3 and  $4 \times 10^{-3}$ , a value significantly lower than those usually obtained in heterotypic crosses (Hassel and Weber, 1978; D'Halluin *et al.*, 1982), but scarcely surprising if both mutations concerned the same gene (Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981). Restriction nuclease analysis of the genome of four ts+ viruses confirmed that they were true recombinants and not revertants. This implied that H5ts1 and H2ts107 mutations were independent but closely located lesions involving different functional domains of the 100K protein. This was supported by the finding that hybrid heterotypic Ad2/Ad5 100K could be functional (Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981).

Preliminary interserotypic recombination data obtained in crosses between H2ts107 and H5ts58 and H5ts36 suggested that H2ts107 mapped between coordinates 69 and 80, as H2ts118 (Table 3). All four ts+ recombinants obtained in cross between H2ts107 and H5ts1 possessed Ad5 sequences at the left of *Xho*I site at 68.4 map units (Asselbergs *et al.*, 1983), and Ad2 sequences rightward from *Eco*RI site at 70.7, implying at least one recombination event between 68 and 70.7 map units (Table 3). These data would position the H2ts107 mutation leftward from coordinates 70-73, where H5ts1 has been previously mapped (Arrand, 1978).

TABLE 2  
COMPLEMENTATION OF H2ts107 WITH OTHER ts MUTANTS OF ADENOVIRUS TYPES 2 AND 5

Mutant <sup>b</sup>	Complementation index <sup>a</sup>				
	H2ts107	H5ts1	H2ts118	H2ts121	H5ts125
H2ts107	( $1.2 \times 10^6$ )	1.0	4.8	70	130
H5ts1		( $3.7 \times 10^6$ )	1.4	100	50
H2ts118			( $3.5 \times 10^6$ )	410	12
H2ts121				( $1.4 \times 10^6$ )	21
H5ts125					( $4.5 \times 10^6$ )

<sup>a</sup> The degree of complementation, expressed as the complementation index (CI), was calculated from the virus yields by the formula  $CI = \text{yield of the double infection} : \text{sum of yields of single infections at } 39.5^\circ$ . Figures in parentheses are infection yields at 39.5° expressed as FFU per  $2.5 \times 10^6$  cells. Complementation was considered as positive when CI was greater than 10.

<sup>b</sup> H2ts118, H2ts121, and H5ts1 were phenotypically hexon-defective mutants. H5ts1 and H2ts118 mapped in the 100K gene, H2ts121 in the hexon gene (D'Halluin *et al.*, 1982). H2ts107 was phenotypically assembly-defective. DNA-negative H5ts125, mapped in the 72K DBP gene (Frost and Williams, 1978) was used as control.

A 0289 + 34, 38c.

VY 2172

7 2

TABLE 3

DNA STRUCTURES OF ADENOVIRUS TYPES 2 (H2) AND 5 (H5) INTERTYPIC *ts*<sup>+</sup> RECOMBINANTS<sup>a</sup>

Recombinant <sup>b</sup>	Designation	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Bam</i> HI	<i>Sma</i> I	<i>Sma</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Sma</i> I	<i>Eco</i> RI	<i>Hind</i> III	<i>Hind</i> III	<i>Eco</i> RI
		29.7	41.7	42.8	54	55.9	59.2	69	70.7	79.6	80.4	89.6
H2 <i>ts</i> 107 × H5 <i>ts</i> 58	R6	2	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5
	R7	2	5	5	5	5	5	5	2	5	5	5
	R8	2	2	2	2	5	5	5	2	5	5	5
H2 <i>ts</i> 107 × H5 <i>ts</i> 36	Φ1	2	2	2	5	5	5	5	2	5	5	5
	Φ2	2	5	5	2	2	2	5	5	5	5	2
	Φ3	2	5	5	2	2	2	5	5	2	2	2
	Φ5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5 <sup>c</sup>
	Φ7	2	2	2	5	5	2	5	2	5	5	5
		<i>Bam</i> HI		<i>Bam</i> HI	<i>Xho</i> I		<i>Eco</i> RI	<i>Xho</i> I	<i>Xho</i> I	<i>Eco</i> RI		<i>Eco</i> RI
		29.7		42.8	53		59.2	68.4	70	70.7		89.6
H2 <i>ts</i> 107 × H5 <i>ts</i> 1	S1	2		2	5		5	5	2	2		2
	S2	5		5	2		5	5	2	2		2
	S5	5		5	5		5	5	2	2		2
	S8	5		5	5		5	5	2	2		2

<sup>a</sup>The numbers 2 and 5 refer to Ad2 or Ad5 DNA sequences at the unique cleavage sites.

<sup>b</sup>The *ts*<sup>+</sup> recombinants were named according to the cross letter and plaque number (D'Halluin *et al.*, 1982).

<sup>c</sup>This type of DNA structure might correspond to a revertant.



A 12.19 + 34.

VY 2192

8

R

*Heterotypic marker rescue.* H2ts107 DNA terminal protein complex was coprecipitated onto 293 cells with recombinant plasmid containing different fragments of Ad5 genome, or with Ad5 DNA restriction fragment isolated in agarose gel. As shown in Table 4, ts<sup>+</sup> recombinants were obtained in cotransfection with Ad5 sequences lying between coordinates 67.8 and 75.9, 67.8 and 71.4, and 69.0 and 72.8, which placed the H2ts107 mutation between 69.0 and 71.4. Since there was no virus rescue by plasmid pVM565, deleted in Ad5 sequence between 68.2 and 69.9, this would suggest that the H2ts107 mutation lies between coordinates 69.0 and 69.9. Similar experiments, performed with H2ts118, another 100K mutant (D'Halluin *et al.*, 1982), placed the H2ts118 lesion between 72.8 and 75.8 map units (Table 5), in the C-terminal domain of the 100K protein (coding sequence: 67.08 to 73.80 map units; nucleotide 24,108 to 26,522; Roberts *et al.*, 1984).

*DNA sequencing of H2ts107 mutant gene.* Nucleotide sequence determination of the mutated region of the H2ts107 100K gene revealed an apparent inversion of nucleotides 25,082 and 25,083. The mutation from codon GAC to codon GCA resulted in a nonconservative change from aspartic acid to alanine at position 324 from the N end of the 100K protein. The apparent inversion was likely to be due to two successive adjacent mutations affecting the second and third base of the same codon.

A computed version of the secondary structure prediction analysis (Chou and Fasman, 1978) of 100K proteins from wild-type and H2ts107 mutant showed no detectable change in their  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, and random conformation. However, hydrophathy plot (Kyte and Doolittle, 1982) revealed a lower accessibility of the hydrophilic domain situated between amino acids 315 and 325 (not shown).

*Biochemical analysis of H2ts107-infected*

TABLE 4  
MARKER RESCUE OF H2ts107 TEMPERATURE-SENSITIVE MUTATION BY Ad5 DNA FRAGMENTS\*

Source of cotransfecting DNA	Map coordinates of rescuing fragment	Number of plaques/dish at 39.5 <sup>°b</sup>
<b>Plasmid</b>		
pVM 504	59.5-75.9	56
pVM 508	59.5-68.2 + 67.8-75.9	40
pVM 509	59.5-65.9 + 75.8-75.9	0
pVM 543	72.8-75.9	0
pVM 565	59.5-68.2 + 69.9-75.8	0
pVM 511	63.6-65.9 + 75.8-75.9	0
<b>Restriction fragment</b>		
HindIII B	72.8-89.1	0
BstEII B	67.8-98.0	65
pVM 508/BqII/HindIII	69.0-72.8	9
pVM 508/BstEII B/KpnI	67.8-71.4	5
<b>Control single transfections</b>		
H2 WT DNA	—	17
pVM 504	—	0
H2ts107	—	0
Mock-infected cells	—	0

\* Monolayer cells (293) were cotransfected with H2ts107 DNA-terminal protein complex and cloned or non-cloned Ad5 restriction fragments. Five micrograms of each DNA was coprecipitated per petri dish, with 3  $\mu$ g of herring sperm DNA as carrier.

<sup>b</sup> Average of three separate experiments comprising two dishes each.



63.2  
2

A 229 + 34, 396.

672192

9

2

TABLE 5

MARKER RESCUE OF H2ts118 TEMPERATURE-SENSITIVE MUTATION BY CLONED Ad5 DNA FRAGMENTS\*

Plasmid	Map coordinates of rescuing fragment	Number of plaques/dish at 39.5°
pVM 504	59.5-75.9	38
pVM 508	59.5-63.9 + 67.8-75.9	45
pVM 509	59.5-65.9 + 75.8-75.9	0
pVM 543	72.8-75.9	27
pVM 565	59.5-68.2 + 69.9-75.8	31
pVM 511	63.6-65.9 + 75.8-75.9	0
Control single transfections		
H2 WT DNA	—	22
pVM 504	—	0
H2ts107	—	0
Mock-infected cells	—	0

\* Marker rescue experiments were performed as indicated in the legend to Table 4.

63.12  
1

*cell polypeptides.* H2ts107-infected HeLa cells were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 1 hr at 17 hr after infection at 39.5°, and chased for periods of time ranging from 0 to 22 hr. The polypeptides were analyzed in SDS-polyacrylamide gel and compared with the WT polypeptide pattern. As shown in Fig. 3A, H2ts107 exhibited a doublet in the 100K/90K domain of the gel, in place of the 100K band found in WT, and great quantities of 45K, and 15K species only present in low amounts in WT. By contrast, WT showed significant amount of label in 54K, 50K, pVI/pVIII and pVII scarcely visible in H2ts107. The 90K species appeared to increase during the chase at 39.5°, but 100K remained visible throughout the chase period (Fig. 3A). H2ts107 assembly intermediate (IM) particles formed upon shift-down to 33° and banding at a density of 1.295-1.285 in CsCl have been recently found to contain great quantities of [<sup>35</sup>S]methionine label in a 90K protein species, and occasionally a 90K/100K doublet, with a predominance of the 90K band (Morin and Boulanger, 1984). Both 100K and 90K were found to be phosphorylated, as shown by the <sup>32</sup>P-labeling pattern of H2ts107 IM particles and to coprecipitate with the anti-100K serum provided by W. Deppert (Fig. 3B). These data and previous observation of a 100K-95K doublet coprecipitating with an anti-hexon monoclonal

antibody (Cepko *et al.*, 1981), strongly suggested that 100K and 90K were related species.

*Precursor-product relationship between 100K and 90K.* Even after prolonged periods of chase at the nonpermissive temperature (20-22 hr), 100K and 90K seemed to coexist in H2ts107-infected cells, and there was no evidence of labeling flow from one species to the other: the label in 90K increased significantly during the chase period, whereas the 100K label remained stable (Fig. 3A). If some structural relationship existed between 100K and 90K species, this would imply that only a limited proportion of the 100K molecules could evolve into 90K product.

H2ts107-infected cells maintained at 39.5° for 18 hr were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine, and virus-induced polypeptides were analyzed in SDS-gel. After staining, the 100K and 90K bands were eluted electrophoretically from the gel slices and fingerprinted in SDS-polyacrylamide gel, using *Staphylococcus* V8 protease (Cleveland *et al.*, 1977). The protease digestion patterns proved the structural identity of 100K and 90K species. The same cleavage products were found in both hydrolyzates, albeit with different stoichiometry, suggesting different protease sensitivity in 100K and 90K: 90K appeared to be more sensitive than 100K, since the



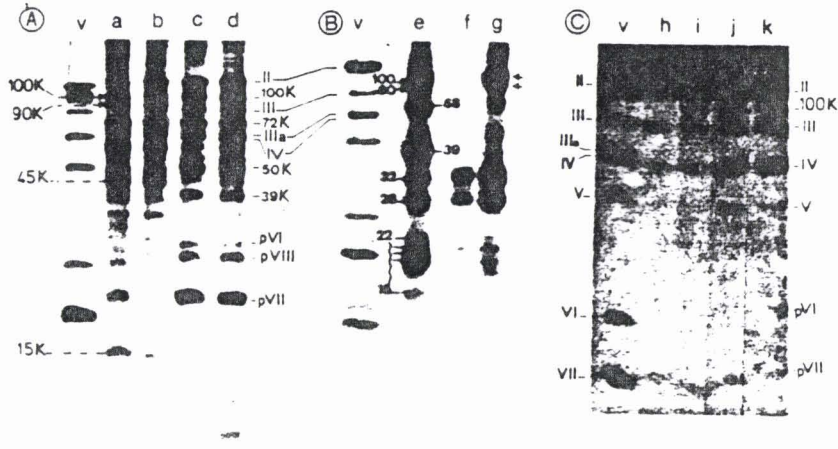


FIG. 3. SDS-polyacrylamide gel analysis of H2ts107-infected cell polypeptides. (A) Infected HeLa cells were pulse-labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 1 hr at 17 hr after infection at 39.5° (lanes a, c), and label chased for 22 hr at the same temperature (lanes b, d). Lanes a and b, H2ts107-infected cells; lanes c and d, Ad2 WT-infected cells. (B) <sup>32</sup>P-Labeling pattern of H2ts107 assembly intermediate (IM) particles formed upon temperature shift-down (33°), and banding at 1.285–1.295 in CsCl. Lane e, untreated IM particles; lane f, deoxycholate (DOC)-disrupted H2ts107 IM particles reacted with preimmune serum; lane g, DOC-disrupted H2ts107 IM particles incubated with anti-100K serum from W. Deppert. The immune complexes were selected onto *S. aureus* cells. Besides major phosphoproteins 68K (IIIa), 39/40K, 32K, and 28K, a 100K/90K doublet and discrete bands ranging from 22K to 15K are also visible. Note that the anti-100K serum coprecipitated large amounts of 32K and 28K with 100K/90K; the same 32K and 28K species were also found precipitated, although to a lesser extent, by the preimmune serum. (C) <sup>14</sup>C Acetylation of H2ts107 proteins. Lane h, H2ts107-infected cells pulse-labeled with [<sup>14</sup>C]acetate for 2 hr at 16 hr after infection at 39.5°; lane i, 2 hr chase at 39.5°; lane j, 4 hr chase; lane k, 6 hr chase. As in the <sup>35</sup>S pattern (lanes a, b), pVI, pVIII, and pVII are scarcely visible. Lane v, control [<sup>35</sup>S]methionine-labeled adenovirion.

same degree of cleavage occurred for lower amounts of enzyme (Fig. 4A).

Since 100K has been found to be a major phosphorylated viral protein (Russell and Blair, 1977; Axelrod, 1978), H2ts107-infected cells were labeled with <sup>32</sup>P at late times after infection, and <sup>32</sup>P-labeled 100K and 90K were isolated and fingerprinted as mentioned above. Both 100K and 90K <sup>32</sup>P patterns showed great similarities in the 45K–25K molecular weight range, but also some differences in the lower molecular weight domain (Fig. 4B). A major polypeptide migrating with an apparent mol wt of 45K was found in both hydrolyzates. This major phosphorylated peptide corresponded to a minor species in [<sup>35</sup>S]methionine pattern (Fig. 4A). Both <sup>35</sup>S and <sup>32</sup>P patterns thus strongly suggested a structural relationship between 100K and 90K.

As for most of the primary translation products of adenovirus (Jörnvall *et al.*,

1974), 100K is N acetylated and can be N labeled *in vivo* with [<sup>14</sup>C]acetate (Boudin *et al.*, 1983). H2ts107-infected cell cultures maintained at 39.5° were labeled with [<sup>14</sup>C]acetate for 2 hr at 16 hr after infection, and chased for different periods of time. The major capsid proteins II, III, IV, and V appeared to be labeled, as well as the nonvirion protein 100K (Fig. 3C). No N labeling was detected in a 90K species even after prolonged periods of chase (Fig. 3C, lane k). This strongly suggested that 90K derived from the 100K by cleavage at its N terminus, as in the case of pVII and pVI (Anderson *et al.*, 1973; Tremblay *et al.*, 1983). This was confirmed by the finding of a [<sup>14</sup>C]acetate-labeled 13.5 kDa polypeptide in H2ts107 IM particles, reacting with the anti-100K-N serum (Fig. 5).

*Immunological studies.* Three antisera were raised in rabbits: two against electrophoretically eluted 100K (referred to as

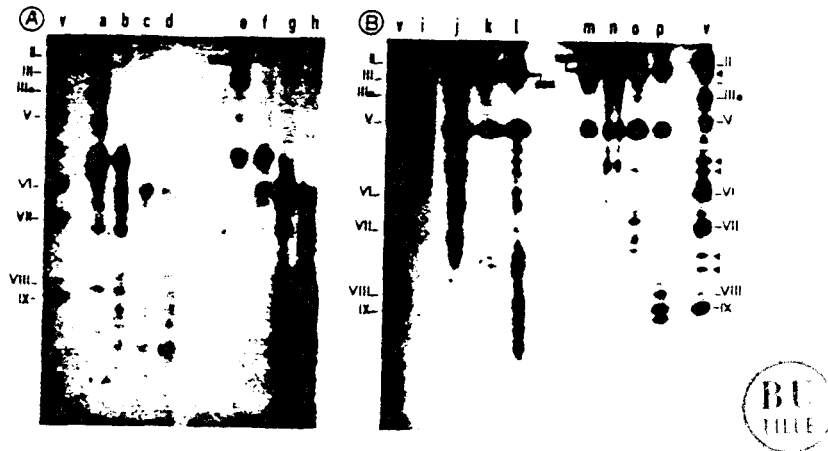


FIG. 4. Peptide fingerprinting of H2ts107 100K and 90K in SDS-polyacrylamide gel. (A) [<sup>35</sup>S]Methionine pattern. (B) <sup>32</sup>P pattern. Protein bands were digested with 0.01 μg (lanes a, e, i, m), 0.05 μg (lanes b, f, j, n), 0.10 μg (lanes c, g, k, o), 0.25 μg (lanes d, h, l, p) of *Staphylococcus* V8 protease. Lanes a-d, i-l: 90K; lanes e-h, m-p: 100K. Lane v: [<sup>35</sup>S]methionine-labeled adenovirus marker. The arrowheads in the right lane v indicate cleavage products from higher molecular weight components of adenovirus, hexon and penton base, due to diffusion of protease from slot p. Differences in labeling intensity of corresponding peptides suggest a higher protease sensitivity for the 90K species.

anti-100K-N and anti-100K-W, respectively) and one against eluted 90K (anti-90K). The anti-100K-N faintly revealed the 100K polypeptide band in western blotting, but failed to react with the 90K species (Fig. 5). The anti-100K-W and anti-90K antibodies revealed both 100K and 90K species. The anti-100K antiserum obtained from W. Deppert also revealed both 100K and 90K proteins (Fig. 3) as well as the anti-100K monoclonal antibody obtained from W. C. Russell (not shown). It might therefore be concluded that 100K and 90K were antigenically related, confirming the precursor-product relationship between both proteins. The fact that anti-100K-N antibody reacted only with 100K and not with the 90K breakdown product suggested that this latter antibody was directed against the N-terminal moiety of the 100K, cleaved off during its processing. Alternatively, the anti-100K-N antibody might recognize conformational structures only present in nonprocessed 100K. The first hypothesis was supported by the finding of an anti-100K-N-reacting peptide band of molecular weight 13.5K, present in IM particles of H2ts107 and in Ad2WT mature virions (Fig. 5). This peptide was likely to

represent the N-terminal domain of the 100K.

**Immunofluorescence microscopy.** To determine the influence of the different types of 100K mutations on hexon assembly and transport to the nucleus, infected HeLa monolayer cells were examined in immunofluorescence microscopy, using the double-staining technique with anti-hexon trimer antibody followed by anti-rabbit sheep γ-globulin. Cells were taken at 30 hr after infection at 39.5° with Ad2WT, 100K-defective H2ts107, H2ts118, and H5ts1 mutants, and hexon-minus mutant H2ts121. As expected, H2ts121 (mutated in the hexon gene) and H5ts1 (which does not form capsomeric hexons) elicited a faint cytoplasmic fluorescence. H2ts118 showed a net perinuclear staining. H2ts107 exhibited a bright nuclear fluorescence, undistinguishable from that observed with WT, but a fainter cytoplasmic staining (Fig. 6). This confirmed that H2ts107 was capable of assembling and transporting hexon trimers to the nucleus, and suggested that H2ts118 was altered in the hexon transport of normally assembled hexon capsomers.

**Topology and neighbor relationships of 100K/90K in virus particles.** The assembly

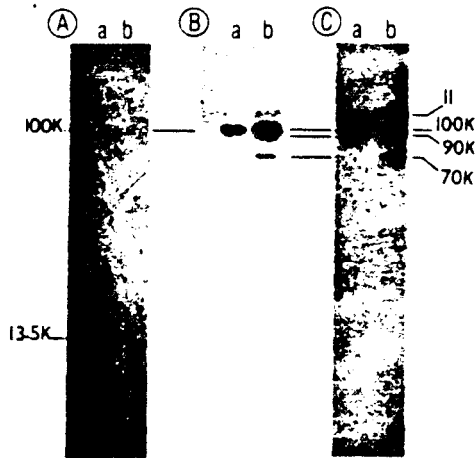


FIG. 5. Immunological reactivity of 100K/90K with different antisera. H2ts107 assembly intermediate (IM) particles (lane b), and H2WT mature virions (lane a) were analyzed in SDS-polyacrylamide gel, electrophoretically blotted on cellulose filter and reacted with rabbit serum anti-100K-N (A), anti-90K (B), and anti-100K-W (C). Immune complexes were revealed by <sup>125</sup>I-protein A. The anti-100K-N serum revealed a 13.5-kDa protein species and traces of 100K in H2ts107 IM particles (A), lane b. The anti-100K and anti-90K antibodies reacted with both 100K and 90K proteins present in H2ts107 IM, and with 100K present in trace amounts in H2WT mature virions ((B) and (C) lanes a). Nonspecific reaction or cross-reactivity occurred between hexon polypeptide and anti-100K serum (C). The 70-kDa band elicited by both anti-100K and anti-90K antibodies in H2ts107 IM particles was likely to represent an intermediate cleavage product of the 100K.

intermediate (IM) particles of H2ts107 formed upon shift-down to 33° contain vast amounts of 90K and remnants of 100K protein (Morin and Boulanger, 1984). IM particles of H2ts107 were disrupted with 0.5% deoxycholate at 56° and subviral entities separated in glycerol gradient (Boulanger *et al.*, 1979). SDS-polyacrylamide gel analysis of the gradient fractions showed that 90K cosedimented with groups of nine hexons, associated with hexon and protein IX (not shown). No detectable 90K was found associated with cores or vertex components.

To confirm this result, topological analysis was performed using different types of antibodies and immunoselection on *S.*

*aureus*-protein A. Pooled H2ts107 IM particles labeled with <sup>32</sup>P and banding at a density range of 1.295-1.285 were treated with deoxycholate and reacted with antisera against capsomeric hexon, penton base, IIIa, and IX. The immune complexes, adsorbed onto *S. aureus* cells, were analyzed in SDS-gel. The immunoprecipitates obtained with anti-hexon and anti-IX contained 90K and polypeptides II (the hexon subunit) and IX. The anti-penton base coprecipitated the polypeptide III along with 100K; the anti-IIIa serum coprecipitated IIIa and 100K (Fig. 7). Together with the centrifugation data of deoxycholate-treated IM particles, this suggested that the nonprocessed 100K protein was associated with the vertex components of the capsid, penton base, and protein IIIa, but not with the peripentonal hexons, whereas the 90K was mainly located at the faces and edges of the icosahedron, associated with groups of nine hexons.

*Affinity chromatography on hexon-Sepharose column.* In hexon-100K complexes, the hexon has been shown to be of monomeric form (Cepko and Sharp, 1983; Gambke and Deppert, 1983). All the data reported above strongly suggested a role in capsid scaffolding of adenovirus 100K protein, distinct from its role in hexon trimerization. A recognition site for hexon capsomer might therefore exist on the 100K molecule distinct from the hexon polypeptide binding site. Affinity chromatography on hexon immobilized on a Sepharose column was intended to determine whether 100K could interact with trimeric hexon. Hexon covalently bound to Sepharose gel and partially denatured with SDS was used as control. Since competition could occur between soluble 100K and hexons present in infected cell extracts, HeLa cells were infected with hexon-minus mutant H2ts121 at the nonpermissive temperature and the cell extract was chromatographed on native hexon- and SDS-denatured hexon column. Found to be retained on native hexon was 100K with a high affinity: all detectable 100K was found to elute with high-salt denaturing buffer (0.8 M KCl, 5 M urea) (Fig. 8A). By contrast, the 100K eluted quantitatively in the ex-

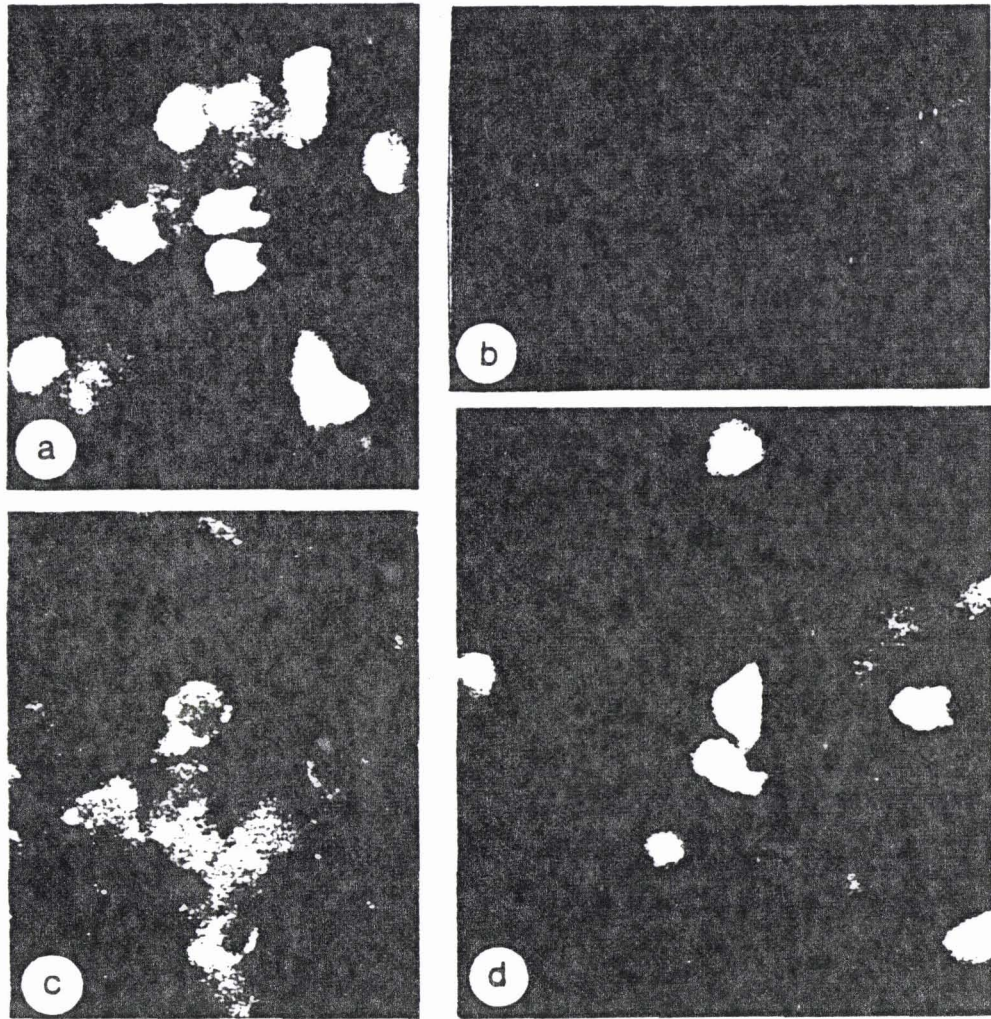


FIG. 6. Immunofluorescence microscopy of Ad2 WT and *ts* mutants. HeLa monolayer cells were infected at a multiplicity of infection of 25 FFU/cell, and incubated at 39.5° for 30 hr. The cells were fixed and reacted with rabbit anti-hexon trimer serum, followed by fluorescein-conjugated sheep anti-rabbit immunoglobulin. (a) Ad2 WT; (b) H5*ts*1; (c) H2*ts*118; (d) H2*ts*107. The fluorescent pattern of hexon-mutant H2*ts*121 was similar to that of H5*ts*1 and was not presented in this figure.

cluded peak of the SDS-denatured hexon-Sepharose column (Fig. 8B). This suggested that 100K might associate with the capsomeric form of hexon and not only with monomeric hexon (Cepko and Sharp, 1982). However, it could not be concluded that the recognition site for hexon trimer was unique, since the site on monomer might remain accessible on hexon trimer. It has to be noted that most of the penton base and fiber were eluted from SDS-denatured

hexon column at relatively low ionic strength (Fig. 8B), and at a higher ionic strength from native hexon-Sepharose (Fig. 8A).

*Affinity chromatography on novobiocin-Sepharose column.* Novobiocin, an inhibitor of procaryotic gyrases, has also been found to be efficient on eucaryotic topoisomerase II. Novobiocin has two independent effects on adenovirus metabolism: (i) inhibition of viral DNA synthesis initiation, and (ii) in-



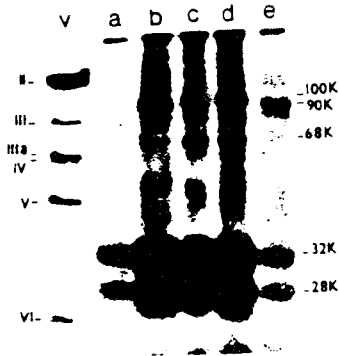


FIG. 7. Neighbor analysis of 100K/90K in H2ts107 assembly intermediate (IM) particles. For better clarity of the band pattern, H2ts107-infected cells were labeled with  $^{35}\text{P}$  at 39.5°. IM particles isolated after shift-down, and treated with deoxycholate (DOC) at 56°. DOC-disrupted particles were incubated with different antisera and immune complexes selected on *S. aureus* protein A. Lane a, preimmune serum; lane b, anti-hexon; lane c, anti-penton base; lane d, anti-protein IIIa; lane e, anti-protein IX; lane v, control [ $^{35}\text{S}$ ]adenovirus. Two intense bands of phosphoproteins (32K and 28K) are immunoprecipitated with all sera used (see also Fig. 3B), including the preimmune serum. Note that anti-penton base serum precipitates the phosphorylated form of IIIa (68K), a result scarcely surprising since vertex components IIIa and penton base might be only partially disrupted by DOC (Boudin *et al.*, 1980).

hibition of DNA encapsidation, possibly via an alteration of a negatively supercoiled conformation of DNA, required for DNA packaging (D'Halluin *et al.*, 1980). Affinity chromatography on novobiocin-Sepharose was performed to determine which viral protein(s) could bind the drug. Since 100K was involved in capsid scaffolding, it might also play a role (direct or indirect) in viral DNA packaging. In the assembly pathway of adenovirus, the entry of viral DNA has been shown to occur simultaneously with the exit of scaffolding proteins (D'Halluin *et al.*, 1978). To test this hypothesis, WT-, H2ts107-, and mock-infected cell extracts at 39.5° were chromatographed on novobiocin affinity gel. The results of affinity chromatography of WT extracts on novobiocin column are presented in Fig. 9. Cell and virus material (93-95%) was excluded from the gel and eluted in the void volume of the column with the starting buffer

(HKET). HKET buffer containing novobiocin (0.1 mg/ml) eluted 0.9-1.5% of the total input label, ATP-Mg $^{2+}$ -containing HKET buffer 0.5-1.5%, high ionic strength buffer 2.8-3.6%, and denaturing urea buffer 1.8-2.0%. SDS-polyacrylamide gel analysis showed that fractions eluted with novobiocin- and with ATP-Mg $^{2+}$ -containing buffers contained significant amounts of 100K, along with the major capsid proteins hexon, penton base, IIIa, and fiber, and the phosphorylated form of the DNA-binding protein (DBP), 75K (Fig. 9B). Additional amounts of 100K and of hexon were eluted with high salt and urea, implying a high degree of affinity for the immobilized ligand. The 100K species was indeed the vi-

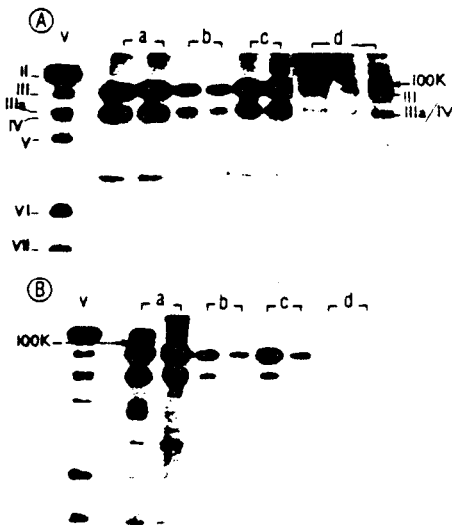


FIG. 8. Affinity chromatography of H2ts121-infected cell extracts on hexon-Sepharose column. HeLa monolayer cells were infected with hexon-defective mutant H2ts121 at the nonpermissive temperature, and labeled with [ $^{35}\text{S}$ ]methionine for 2 hr at 16 hr after infection. Cell extracts were prepared as described in the text and chromatographed on hexon affinity Sepharose gel. (A) Native hexon column; (B) SDS-denatured hexon column. Lane a, excluded material eluted in the void volume and with the rinsing buffer (HKET); lane b, HKET + 0.2 M KCl; lane c, HKET + 0.8 M KCl; lane d, HKET + 0.8 M KCl + 5 M urea; lane v, control adenovirus. Note that all detectable 100K was eluted in the void volume of the SDS-hexon column (B, lane a), and with high ionic strength-denaturing buffer from the native hexon affinity gel (A, lane d).

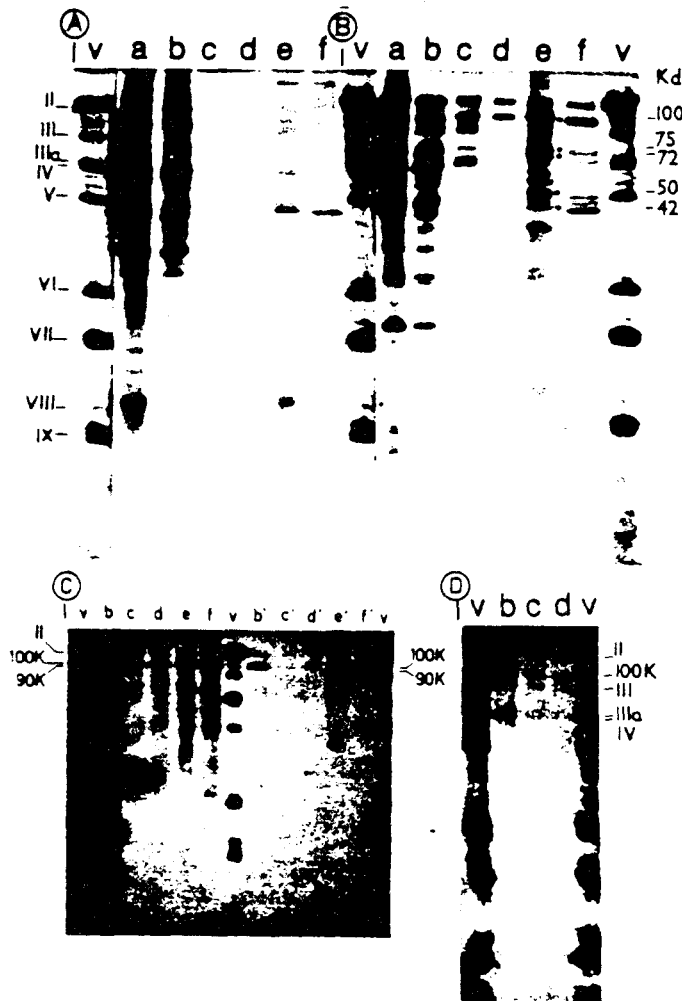


FIG. 9. Affinity chromatography on novobiocin-Sepharose column. Infected HeLa monolayer cells were labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 2 hr at 16 hr after infection at 39.5° with (A) mock inoculum, (B, D) Ad2 WT, (C) H2ts107. Cell extracts (a: starting material) were loaded on novobiocin affinity gel, and eluted with the successive buffers (b), HKET; (c), HKET + novobiocin; (d), HKET + ATP + Mg<sup>2+</sup>; (e), HKET + 0.8 M KCl; (f), 4 M NaCl + 2 M urea. (v) Control adenovirion. (D) Fractions from Ad2 WT extract eluted with HKET-novobiocin buffer and corresponding to lane (B, c), re-chromatographed on the same novobiocin column. (C, lanes b-f) H2ts107 chromatographic fractions immunoselected on *S. aureus* cells, using anti-100K-W antibody. H2ts107 100K-90K doublet was not eluted with novobiocin-buffer (C, lanes c, c'). Actin (42K) was the major cellular component binding to novobiocin column in both infected and mock-infected extracts.

rus-coded 100K protein since it had no mock-infected cell counterpart (Fig. 9A). The occurrence of 100K in nonnegligible quantities in the excluded peak of the column, along with the major capsid proteins suggested that only a limited number of 100K molecules possessed an affinity for

novobiocin, or novobiocin-binding component(s). At high ionic strength, and to a lesser extent with denaturing urea-buffer, a major doublet band of 75K-72K, and discrete protein species migrating as IVa2, 50K, 39K, pVI, pVIII, and pVII were also eluted (Fig. 9B, lanes e, f).

Gel scanning of novobiocin-Sepharose chromatographic fractions showed that 100K constituted 20% of the proteins eluted with the novobiocin-containing buffer, and 35% of the material eluted with ATP-Mg<sup>2+</sup> (Table 6). The fractions eluted with the novobiocin-containing buffer were pooled, dialyzed against the equilibrating buffer, and rechromatographed on the same novobiocin-Sepharose column in a second cycle of affinity chromatography. There was an enrichment in 100K species in the novobiocin and ATP-Mg<sup>2+</sup> eluates, compared with the other capsid proteins (Fig. 9D and Table 4). The stoichiometry of 100K to hexon was 0.8 and 1.2 in novobiocin and ATP-Mg<sup>2+</sup> eluates of the first cycle of affinity chromatography, and 1.9 and 1.7, respectively, in the second cycle (Table 6). High salt and denaturing buffers eluted the pair 100K hexon in a still higher ratio of 100K over hexon (2.7, Table 6). Hexon, penton base, IIIa and fiber appeared always as partner proteins of the 100K in fractions eluted at low ionic strength with novobiocin- or

ATP-Mg<sup>2+</sup>-containing buffer (Figs. 9B, D), and DBP at high ionic strength or in denaturing buffer (Fig. 9B, e, f). However, this latter type of elution was less specific than that using the soluble ligand novobiocin or ATP-Mg<sup>2+</sup>, and might correspond to non-specific binding of proteins to the resin via electric charges or hydrophobic interactions.

The effect of the mutation on the novobiocin-binding property of H2ts107 100K was analyzed by affinity chromatography. H2ts1107-infected cell extracts labeled at 39.5° were chromatographed on novobiocin-Sepharose gel. As shown in Fig. 9C, the 90K protein was found to behave as the 100K and to be retained on the column with the same affinity. However, the H2ts107 100K-90K doublet behaved differently from the WT 100K. No detectable 100K-90K species were found in the novobiocin-containing buffer and most of these proteins appeared eluted at higher ionic strength than in WT, with ATP-Mg acetate-containing buffer, and with high ionic

bands  
h

TABLE 6  
AUTORADIOGRAM SCANNING OF NOVOBIOCIN-AFFINITY CHROMATOGRAPHIC FRACTIONS\*

Fraction	Percentage of label in polypeptide					Polypeptide ratio 100K:II
	II	100K	III	72/75K <sup>b</sup>	66-12K <sup>c</sup>	
First cycle <sup>d</sup>						
Excluded peak	10.4	5.3	8.1	7.2	68.9	0.51
Novobiocin eluate	23.2	20.0	13.2	5.1	38.5	0.86
ATP-Mg <sup>2+</sup>	28.0	34.9	10.5	4.7	21.8	1.24
0.8M KCl	6.8	18.2	7.0	17.4	57.4	2.67
NaCl-urea	8.8	23.8	8.5	14.9	48.9	2.70
Second cycle <sup>d</sup>						
Excluded peak	28.7	11.3	14.7	ND <sup>e</sup>	45.2	0.39
Novobiocin eluate	11.9	23.0	18.7	ND	46.3	1.92
ATP-Mg <sup>2+</sup> eluate	12.0	20.5	13.2	ND	54.1	1.71

\* Figures in Table corresponded to the average of the results of two novobiocin-Sepharose chromatographs, as depicted in gels of Fig. 9.

<sup>b</sup> The 72K-75K doublet corresponded to the nonphosphorylated and phosphorylated forms of the DNA-binding protein.

<sup>c</sup> This portion of the gel lane scans corresponded to all bands migrating from IIIa-fiber polypeptide doublet band (66/62K) to protein IX (12K).

<sup>d</sup> The fractions eluted with novobiocin-containing buffer were pooled, dialyzed, and rechromatographed onto the same novobiocin-Sepharose column.

<sup>e</sup> ND: Not detected.

A 1259 + 35, 40c.

04 2172

17

3

strength and denaturing buffers (Fig. 9C, lanes d-f, d'-f'). This suggested that the mutation of H2ts107 altered the affinity of 100K for novobiocin, thereby affecting its binding to the affinity column.

The results of novobiocin-Sepharose chromatographs might be explained in at least two ways: (i) The 100K protein (and the 90K species) possessed a direct affinity for novobiocin. (ii) The 100K interacted with other viral or cellular protein(s) (e.g., topoisomerase II) retained specifically on the novobiocin gel. In both hypotheses, the N-terminal domain of the 100K, processed in 90K, would not be involved in its direct or indirect binding to novobiocin affinity gel.

Topoisomerase II activity was assayed in novobiocin-eluted fractions from WT-, H2ts107, and mock extracts. Similar specific topoisomerase activities, ranging from 600 to 1200 mU/1000 <sup>35</sup>S cpm were found in all samples tested. This might suggest the absence of virus-coded, or virus-induced, or virus-stimulated topoisomerase-like enzyme(s) in adenovirus-infected cells. In an alternative hypothesis, cellular topoisomerase II activity could mask some virus-coded enzyme(s).

*Binding of [<sup>14</sup>C]novobiocin probe with adenovirus polypeptides.* The capacity of 100K and of other possible adenovirus structural and nonstructural polypeptides to bind with novobiocin was explored by another method. H2WT-, H2ts107-, and mock-infected cells at 39.5° were electrophoresed on SDS-polyacrylamide gels and probed with [<sup>14</sup>C]novobiocin after renaturation of the proteins by blotting on nitrocellulose filter (Towbin *et al.*, 1974) or by the gel overlay technique (Otto, 1983). No detectable band of [<sup>14</sup>C]novobiocin-labeled compound was found at the position of 100K, hexon, or other defined virus polypeptides, using both procedures (not shown). However, when polyacrylamide gel was renatured in the presence of [<sup>14</sup>C]novobiocin-containing buffer, a discrete labeled band was found in the H2ts107 sample, and to a lesser extent in the WT sample, within the spacer gel at the limit of the resolving gel (not shown). This suggested that the component(s) binding the drug was formed of

high molecular weight protein complex or was covalently bound to DNA fragments not entering the gel.

#### DISCUSSION

The results obtained with H2ts107 confirmed previous investigations. They yielded further evidence of the role of the adenovirus-coded 100K protein in the scaffolding of virus particle (Gambke and Deppert, 1981; Morin and Boulanger, 1984). H2ts107 failed to assemble virions but was capable of assembling stable hexon trimers at the nonpermissive temperature. Its lesion was mapped in the 100K gene, between 69.0 and 69.9 map units, leftward from the H5ts1 mutation, and at a genomic distance sufficient to allow interserotypic recombination to occur, albeit with a low frequency ( $3-4 \times 10^{-3}$ ).

Comparison of the properties of H2ts107 with the other 100K-minus mutants H5ts1 and H2ts118 suggested that at least three, and possibly four, independent functions were carried on by the 100K protein.

(i) Trimerization of hexon, a property altered in H5ts1 (Russell *et al.*, 1972; Cepko and Sharp, 1983), as well as in most other 100K-defective mutants thus far isolated: H5ts17 and H5ts20 (Leibowitz and Horwitz, 1975), H5ts115 and H5ts116 (Ginsberg *et al.*, 1974; Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981). The trimerization function would be located in the C-terminal moiety of the 100K molecule, since H5ts1 has been mapped between 70 and 73 map units (Arand, 1978; Frost and Williams, 1978), and H5ts115 between 70 and 75.9 (Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981). However, marker rescue of H5ts116 mutation by WT DNA sequences between 67 and 70.7 (Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981) was in apparent conflict with this latter assumption: H2ts116 failed to trimerize hexons, and this would place the trimerization function in the N-terminal region of the 100K molecule. These results were not contradictory if one considers that a mutation in one region of a protein can influence the structure and function of a remote domain of the same protein, and that the rescuing fragment 67-70.7 overlapped coordinate 70.

H2ts116 might therefore lie to the right from coordinate 70, in the C-terminal region—functionally speaking—of the 100K, as in the other hexon-trimer-minus mutants.

(ii) Hexon transport, affected in the 100K-minus mutant H2ts118. This role would also be devoted to the C-terminal end of the 100K, between 72.8 (determined by the leftward coordinate of the rescuing fragment) and 73.8 map units (the end of the coding sequence of 100K gene). However, H5ts147, mutated in the precursor pVI to virion protein VI, also failed to transport hexons to nucleus (Kauffman and Ginsberg, 1976). An interpretation of these apparent ambiguities might be that a subtle misassembly of hexon capsomers induced by H2ts118 would render them temperature-sensitive and untransportable to nucleus, a function normally assumed by pVI.

(iii) Scaffolding of adenovirus particle, mutated in H2ts107 (Morin and Boulanger, 1984). This function would lie in the central domain of the 100K, between amino acid 300 and 400 from the N end. In contrast with other 100K mutants H5ts17 and H5ts20 (Leibowitz and Horwitz, 1975), H5ts115 and H5ts116 (Oosterom-Dragon and Ginsberg, 1981), and H5ts147 (Kauffman and Ginsberg, 1976), which could not assemble infectious virus in the presence of cycloheximide after the shift down from 39.5 to 32°C, H2ts107 was capable of assembling infectious particles upon shift-down in the presence of the drug (Morin and Boulanger, 1984). The H2ts107 100K protein synthesized at 39.5°C might therefore assume its scaffolding function at 33°C, and nascent 100K protein was not required for intranuclear capsid assembly. The results of affinity chromatography of 100K on hexon-Sepharose column suggested that 100K possesses a binding site for hexon capsomer different from the affinity site for unassembled monomeric hexons (Cepko and Sharp, 1982, 1983; Gambke and Deppert, 1983).

A 90K species was found in vast amounts in assembly intermediate (IM) particles of H2ts107 formed after shift-down (Morin and Boulanger, 1984). 90K was structurally and antigenically related to 100K and was

presumed to be a cleavage product of the latter, generated by processing at its N terminus (Figs. 3, 4), as for other virus protein precursors (Tremblay *et al.*, 1983). The respective locations and neighbor relationships of 100K and 90K within the IM particles were determined by coprecipitation with various antibodies of subviral structures obtained after partial capsid disruption. It appeared that 100K was associated with vertex components IIIa and penton base, whereas the 90K species was found in groups of nine hexons constituting the faces and edges of the capsid (Fig. 7). This and previous results (Morin and Boulanger, 1984) suggested a maturation process starting at the faces and edges and ending at the vertices. In other words, the components present in the faces and edges of the capsid would be "older" in the assembly pathway than the vertex structures. As an hypothesis, the scaffolding protein 100K might migrate to the capsid faces to be processed and released from the particle upon virus maturation.

(iv) The 100K protein was also found to be one of the major viral proteins retained on novobiocin-Sepharose column (Fig. 9). This association might be direct or be mediated by cellular or viral proteins, or both. The property of 100K to bind with novobiocin was also present in the 90K species, which suggested that the N-terminal domain of the 100K, processed into 90K, was not implicated in the binding, either directly, or indirectly via conformational effect. The 100K-90K doublet found in H2ts107 extracts at 39.5°C showed an elution pattern from novobiocin column different from that of WT. 100K was not eluted with novobiocin-containing buffer, as was WT 100K, but eluted with ATP-Mg<sup>2+</sup>, high salt and denaturing buffers (Fig. 9). Both scaffolding function and novobiocin-binding capacity of 100K-90K proteins appeared therefore altered in the H2ts107 mutant. Two point mutations on the same codon were found in the H2ts107 100K gene, resulting in a nonconservative amino acid change (aspartic acid to alanine) at position 324 from the N-terminal end of the 100K, i.e., in a central, hydrophilic domain of the 100K protein. Because both consisted

of base transversions, these mutations could not be due to nitrous acid treatment; H2ts107 was most likely to be a spontaneous mutant isolated during the selective procedure.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from CNRS (UA-538), INSERM (U-233), and the Université du Droit et de la Santé de Lille (UER-III). We gratefully acknowledge the support of C. Cousin in supplying mutant stocks, that of J. C. D'Halluin in topoisomerase II assays, and the valuable advice of J. P. Henichart in the synthesis of the novobiocin affinity gels. We also thank W. Deppert and W. C. Russell for providing us with anti-100K antibodies, J. Williams and J. Weber for ts mutants, J. C. Beauvillain and C. Vandepierre for immunofluorescence photographs, D. J. Williams for critical reading of the English manuscript, and P. Lemay for computerization of protein sequences.

REFERENCES

ANDERSON, C. W., BAUM, P. R., and GESTELAND, R. F. (1983). Processing of adenovirus-2 induced proteins. *J. Virol* 12, 241-252.

ARNDT-JOVIN, D. J., JOVIN, T. M., BÄHR, W., FRISCHAUF, A. M., and MARQUARDT, M. (1975). Covalent attachment of DNA to agarose. Improved synthesis and use in affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 54, 411-418.

ARRAND, J. E. (1978). Mapping of adenovirus type 5 temperature-sensitive mutations by marker rescue in enhanced double DNA infections. *J. Gen. Virol.* 41, 573-586.

ASSELBERGS, F. A., SMART, J. E., and MATHEWS, M. B. (1983). Analysis of expression of adenovirus DNA (fragments) by microinjection in *Xenopus* oocytes. Independent synthesis of minor early region 2 proteins. *J. Mol. Biol.* 163, 209-238.

AXELROD, N. (1978). Phosphoproteins of adenovirus 2. *Virology* 87, 366-383.

BOUDIN, M. L., D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1980). Human adenovirus type 2 protein IIIa. II. Maturation and encapsidation. *Virology* 101, 144-156.

BOUDIN, M. L., RIGOLET, M., LEMAY, P., GALIBERT, F., and BOULANGER, P. (1983). Biochemical and genetical characterization of a fiber-defective temperature-sensitive mutant of type 2 adenovirus. *EMBO J.* 2, 1921-1927.

BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G. E., and RUSSELL, W. C. (1979). Characterization of adenovirus protein IX. *J. Gen. Virol.* 44, 783-800.

BOULANGER, P., and PUVION, F. (1973). Large-scale preparation of soluble adenovirus hexon, penton and fiber antigens in highly purified form. *Eur. J. Biochem.* 39, 37-42.

CASJENS, S., and KING, J. (1975). Virus assembly. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 551-611.

CEPKO, C. L., CHANGELLAN, P. S., and SHARP, P. (1981). Immunoprecipitation with two-dimensional pools as a hybridoma screening technique: Production and characterization of monoclonal antibodies against adenovirus 2 proteins. *Virology* 110, 385-401.

CEPKO, C. V., and SHARP, P. A. (1982). Assembly of adenovirus major capsid protein is mediated by a non-virion protein. *Cell* 31, 407-415.

CEPKO, C. L., and SHARP, P. A. (1983). Analysis of Ad5 hexon and 100 K ts mutants using conformation-specific monoclonal antibodies. *Virology* 129, 137-154.

CHOU, P. Y., and FASMAN, G. D. (1978). Empirical predictions of protein conformation. *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276.

CLEVELAND, D. W., FISCHER, S. G., KIRSCHNA, M. W., and LAEMMLI, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecylsulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102-1106.

COLWILL, R. W., and SHEKININ, R. (1983). ts A1S9 locus in mouse L cells may encode a novobiocin binding protein that is required for DNA topoisomerase II activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 4644-4648.

D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., and BOULANGER, P. (1982). Physical mapping of adenovirus type 2 temperature sensitive mutations by restriction endonuclease analysis of interserotypic recombinants. *J. Virol.* 41, 401-413.

D'HALLUIN, J. C., COUSIN, C., NIEL, C., and BOULANGER, P. (1984). Characterization of an early temperature-sensitive and cytotoxic double mutant of adenovirus type 2. *J. Gen. Virol.* 65, 1305-1317.

D'HALLUIN, J. C., MARTIN, G. R., TORPIER, G., and BOULANGER, P. (1978). Adenovirus type 2 assembly analyzed by reversible cross-linking of labile intermediates. *J. Virol.* 28, 357-363.

D'HALLUIN, J. C., MILLEVILLE, M., and BOULANGER, P. (1980). Effects of novobiocin on adenovirus DNA synthesis and encapsidation. *Nucleic Acids Res.* 8, 1625-1641.

EDVARDSSON, B., EVERITT, E., JÖRNVALL, H., PRAGE, L., and PHILIPSON, L. (1976). Intermediates in adenovirus assembly. *J. Virol.* 19, 533-547.

EGGERDING, F. A., and PIERCE, W. C. (1983). Construction of a cloned library of adenovirus DNA fragments in bacteriophage M13. *J. Biol. Chem.* 16, 10090-10097.

ENGVALL, E., and PERLMANN, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.

FROST, E., and WILLIAMS, J. F. (1978). Mapping temperature-sensitive and host-range mutations of adenovirus type 5 by marker rescue. *Virology* 91, 39-50.

GINSBERG, H. S., ENSINGER, M. J., KAUFMANN, R. S.,

- MAYER, A. J., and LUNDHOLM, U. (1974). Cell transformation: A study of regulation with types 5 and 12 adenovirus temperature-sensitive mutants. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 39, 419-426.
- GAMBEKE, C., and DEPPERT, W. (1981). Late non-structural 100,000 and 33,000-dalton proteins of adenovirus type 2. I. Subcellular localization during the course of infection. *J. Virol* 40, 585-593.
- GAMBEKE, C., and DEPPERT, W. (1983). Specific complex of the late non-structural 100,000 dalton protein with newly synthesized hexon in adenovirus type 2-infected cells. *Virology* 124, 1-12.
- HASSELL, J. A., and WEBER, J. (1978). Genetic analysis of adenovirus type 2. VIII. Physical locations of temperature sensitive mutations. *J. Virol* 23, 671-678.
- HODGE, L. D., MANCINI, P., DAVIS, F. M., and HEYWOOD, P. (1977). Nuclear matrix of HeLa S<sub>2</sub> cells, polypeptide composition during adenovirus infection and in phases of the cell cycle. *J. Cell Biol* 72, 194-208.
- ISHIBASHI, M., and MAIZEL, J. V. (1974). The polypeptides of adenovirus. II. Young virions, structural intermediates between top components and aged virions. *Virology* 57, 409-424.
- JÖRNVALL, H., OHLSSON, H., and PHILIPSON, L. (1974). An acetylated N-terminus of adenovirus 2 hexon protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 56, 304-310.
- KAUFFMAN, R. S., and GINSBERG, H. S. (1976). Characterization of a temperature-sensitive hexon transport mutant of type 5 adenovirus. *J. Virol* 19, 643-658.
- KESSLER, S. W. (1975). Mapped isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of the antibody-antigen complexes with protein A. *J. Immunol* 115, 1617-1624.
- KRULER, W., VAN SCHAIK, F. M. A., and SUSSENBACH, J. S. (1981). Structure and organization of the gene coding for the DNA binding protein of adenovirus type 5. *Nucleic Acids Res* 9, 4439-4457.
- KYTE, J., and DOOLITTLE, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol* 157, 105-132.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- LEIBOWITZ, J., and HORWITZ, M. S. (1975). Synthesis and assembly of adenovirus polypeptides. III. Reversible inhibition of hexon assembly in adenovirus type 5 temperature-sensitive mutants. *Virology* 66, 10-24.
- LEMAY, P., and BOULANGER, P. (1980). Physicochemical characteristics of structural and non-structural proteins of human adenovirus 2. *Ann. Virol* 131, 259-275.
- MARTIN, G. R., WAROCQUIER, R., COUSIN, C., D'HALUIN, J. C., and BOULANGER, P. (1978). Isolation and phenotypic characterization of human adenovirus type 2 temperature-sensitive mutants. *J. Gen. Virol* 41, 303-314.
- MORIN, N., and BOULANGER, P. (1984). Morphogenesis of human adenovirus type 2: Sequence of entry of proteins into previral and viral particles. *Virology* 136, 153-167.
- OOSTEROM-DRAGON, E., and GINSBERG, H. S. (1981). Characteristics of two temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus with mutations in the 100,000-dalton protein gene. *J. Virol* 40, 491-500.
- OTTO, J. J. (1983). Detection of vinculin-binding proteins with an <sup>125</sup>I-vinculin gel overlay technique. *J. Cell Biol* 97, 1283-1287.
- PETTERSSON, U. (1984). Structural and nonstructural adenovirus proteins. In "The Adenoviruses" (H. S. Ginsberg, ed.), Chap. 6, pp. 205-270. Plenum, New York.
- ROBERTS, R. J., O'NEILL, K. E., and YEN, C. T. (1984). DNA sequences from the adenovirus 2 genome. *J. Biol. Chem.* 259, 13968-13975.
- RUSSELL, W. C., and BLAIR, G. E. (1977). Polypeptide phosphorylation in adenovirus-infected cells. *J. Gen. Virol* 34, 19-35.
- RUSSELL, W. C., NEWMAN, C., and WILLIAMS, J. F. (1972). Characterization of temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5. Serology. *J. Gen. Virol* 17, 45-57.
- RUSSELL, W. C., and PRECIOUS, B. (1982). Nucleic acid-binding properties of adenoviruses structural polypeptides. *J. Gen. Virol* 63, 69-79.
- STAUDENBAUER, W. L., and ORR, E. (1981). DNA gyrase: Affinity chromatography on novobiocin-Sepharose and catalytic properties. *Nucleic Acids Res* 9, 3589-3603.
- SUNDQUIST, B., PERSSON, T., and LINDBERG, U. (1977). Characterization of mRNA-protein complexes from mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 4, 899-915.
- TASSERON-DE JONG, J. G., BROUWER, J., RIETVELD, K., ZOETEMELK, E. M., and BOSCH, L. (1979). Messenger ribonucleoprotein complexes in human KB cells infected with adenovirus type 5 contain tightly bound viral-coded 100 K proteins. *Eur. J. Biochem.* 100, 271-283.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T., and GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- TREMLAY, M., DERY, C., TALBOT, B., and WEBER, J. (1983). In vitro cleavage specificity of the adenovirus type 2 protease. *Biochim. Biophys. Acta* 743, 239-245.
- WILHELM, J. M., and GINSBERG, H. S. (1972). Synthesis in vitro of type 5 adenovirus capsid proteins. *J. Virol* 9, 973-980.
- WILLIAMS, J. F., GHARPURE, S., USTACELEBI, S., and MAC DONALD, S. (1971). Isolation of temperature sensitive mutants of adenovirus type 5. *J. Gen. Virol* 11, 96-101.

