

VIROLOGIE DES INVERTÉBRÉS. — *Mise en évidence, stabilisation et purification d'une structure nucléoprotéique intracapsidaire chez le Baculovirus d'Oryctes rhinoceros L.* Note (*) de MM. Pierre Monsarrat, Bernard Revet et Igor Gourevitch, présentée par M. Constantin Vago.

La présence d'une structure nucléoprotéique dans le virion du Baculovirus du coléoptère *Oryctes rhinoceros L.* est montrée. Cette structure est stabilisée et purifiée. Elle se présente sous la forme d'un bâtonnet de 280 nm sur 15 nm contenant la molécule d'ADN. Une protéine basique a été isolée du virus.

En raison de sa large utilisation en lutte biologique [(1) à (4)] et de la mise au point de techniques de production de masse, le virus du coléoptère *Oryctes rhinoceros L.* représente un matériel privilégié d'étude de nombreux problèmes d'épizootiologie (5) et de virologie structurale.

Des études portant sur la pathogenèse [(5), (6), (7)], la structure (8), les caractéristiques de la molécule d'ADN [(9), (10)] et les relations sérologiques (11) de ce virus, ont permis d'envisager sa classification dans le groupe des Baculovirus.

L'observation, lors des premières purifications du virus (8) (*fig. 2*), de bâtonnets filamenteux sortant de la capsid, a attiré notre attention. La difficulté à extraire les protéines des préparations d'ADN du virus ainsi que les caractéristiques particulières de cette molécule [(10), (11)] nous ont conduits à développer l'étude de ces structures filamenteuses et à concevoir une technique pour leur extraction.

L'examen des modifications de ces filaments montre un passage continu du bâtonnet au déploiement complet de la molécule d'ADN (*fig. 1, 4, 5*) ce qui nous incite à attribuer à cette structure la valeur d'une nucléoprotéine organisée.

OBTENTION DU VIRUS. — Le virus est obtenu à partir de déjections d'adultes recueillies dans un tampon phosphate 10^{-2} M, pH 8,5, contenant 12 % de saccharose et divers antibiotiques (12). La quantité de virus produite par cette technique a pu être estimée sur larves de 2^e stade à 10^9 DL 50 par adulte et par jour. Le virus est purifié par un cycle de centrifugations en gradients de saccharose, suivant la technique précédemment décrite (8).

DÉGRADATION MÉNAGÉE DU VIRUS. — Sous l'action du thioglycolate de sodium à pH basique, la particule virale subit une dégradation progressive.

Après 1 h d'action du réducteur, l'observation en microscopie électronique, après coloration à l'acétate d'uranyle 4 %, montre que la plupart des particules sont pénétrées par le colorant.

Sur les particules les moins dégradées, la nucléoprotéine apparaît comme un filament adhérent à une extrémité de la capsid et placé entre celle-ci et l'enveloppe. La lyse complète de la capsid libère le filament dans l'enveloppe et par rupture de celle-ci dans le milieu.

19 DEC 1975
O. P. S. T. O. M.

Collection de Référence

M n° 7928 Ent. Agr.

STABILISATION DE LA STRUCTURE NUCLÉOPROTÉIQUE. — Après différents essais, il nous est apparu que la stabilité de la structure native nucléoprotéique dépend de trois facteurs principaux : le pH, la force ionique et le rapport des quantités de virus et de mélange réducteur.

La structure de la nucléoprotéine libérée est stable pendant plusieurs jours en utilisant, pour la dégradation du virus, une solution de thioglycolate 0,1 M et carbonate de sodium 0,7 M à pH 10,2 maintenue à 4°. Les proportions respectives du mélange basique réducteur et de virus sont de 4 volumes pour 1 volume de suspension virale de 10 de D. O. à 260 nm.

PURIFICATION DE LA STRUCTURE NUCLÉOPROTÉIQUE. — Par centrifugation différentielle de suspensions virales incubées 14 h dans le mélange réducteur, nous obtenons des préparations de nucléoprotéines.

Le surnageant d'une première centrifugation de 60 mn à 114 000 g est mis au culot pendant 2 h à 300 000 g sur un rotor « SW 50. I ». L'examen de suspension du dernier culot montre qu'il est essentiellement composé de nucléoprotéines (*fig. 6*).

Une purification plus complète est obtenue en répétant sur cette suspension le cycle des deux centrifugations.

La purification de la nucléoprotéine est aussi obtenue directement en plaçant la suspension de virus dégradée au sommet d'un gradient de saccharose 0-45 % poids/poids reposant sur un coussin de saccharose 60 % poids/poids. Les solutions de saccharose sont faites dans le mélange réducteur à pH 10,2. Après centrifugation de 15 h à 300 000 g la nucléoprotéine est recueillie au niveau du coussin. Une bande formée par les enveloppes vides apparaît dans le gradient.

L'examen au microscope électronique de préparations de nucléoprotéines montre qu'elles se présentent sous la forme de bâtonnets assez rigides d'environ 280 nm sur 15 nm. Une structure de surface composée de sous-unités placées selon une symétrie hélicoïdale paraît probable (*fig. 3*).

L'examen après étalement des particules virales selon la technique décrite par Dubochet (¹³), suivi d'un ombrage rotatif au platine, révèle la présence d'une structure en hélice du bâtonnet, lorsque celui-ci s'est trouvé éjecté de la capsidie (*fig. 1 et 4*).

EXPLICATION DE LA PLANCHE

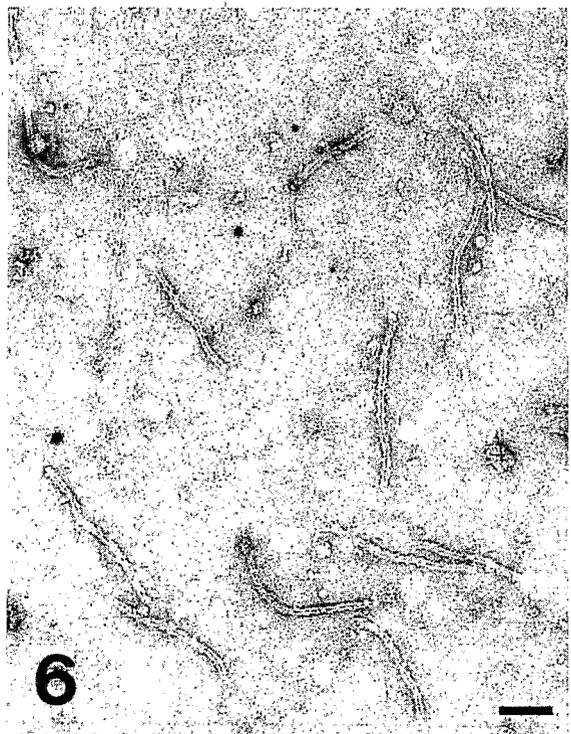
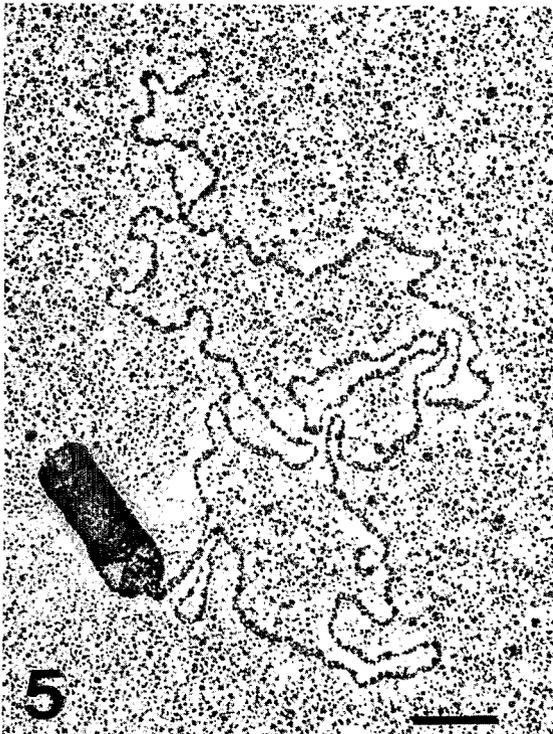
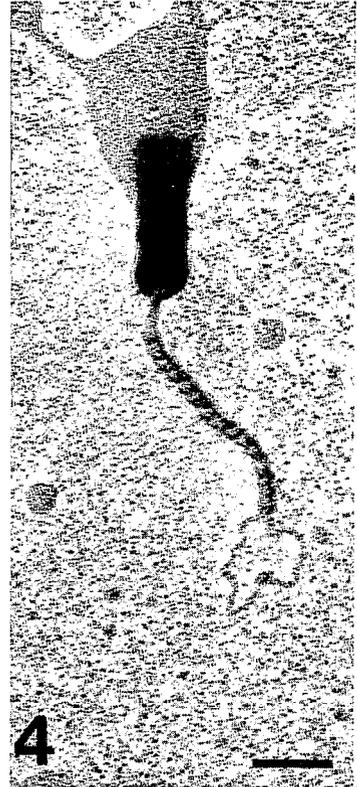
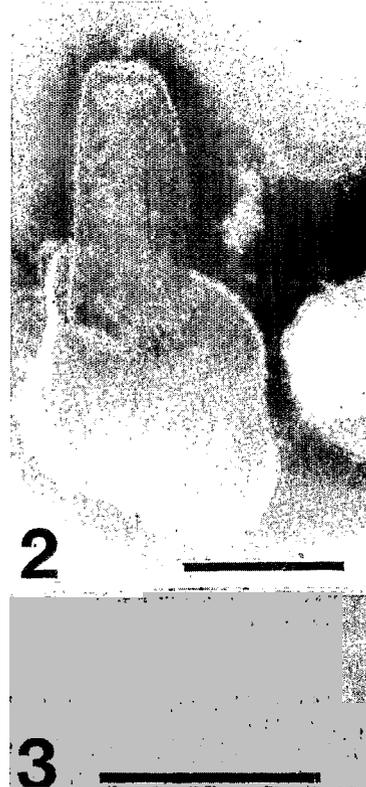
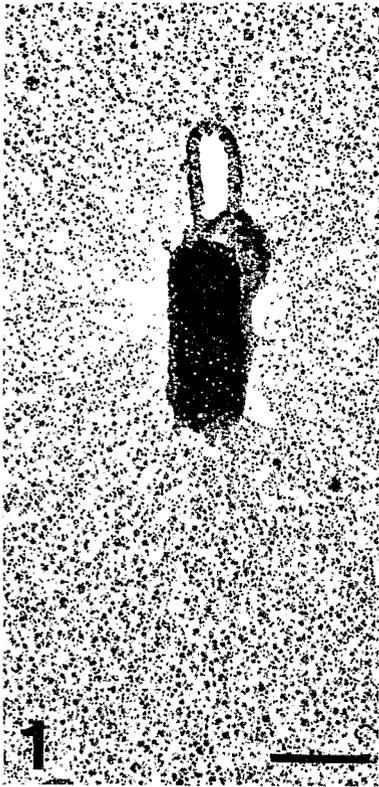
Les barres représentent 0,1 μ .

Fig. 1, 4 et 5. — Structures nucléoprotéiques sortant de la capsidie virale. Coloration acétate d'uranyle 1 % et ombrage rotatif après étalement par la technique de Dubochet.

Fig. 2. — Structure nucléoprotéique. Coloration négative, acétate d'uranyle 4 %.

Fig. 3. — Détail d'une partie de structure N. P. dans les conditions de stabilisations. Coloration négative, acétate d'uranyle 4 %.

Fig. 6. — Préparation de structures nucléoprotéiques. Coloration négative, acétate d'uranyle 4 %.



DISCUSSION. — Des structures nucléoprotéiques organisées, participant à l'architecture générale du virus et indépendantes de la capsidie, n'ont été décrites, à notre connaissance, que chez certains Rhabdovirus (¹⁴) et chez deux Arbovirus [(¹⁵), (¹⁶)]. Parmi les virus à ADN la présence d'une structure filiforme considérée comme liée à la capsidie a été notée dès 1964 chez un Baculovirus (¹⁷) par Vago et étudiée par Ponsen (¹⁸). La présence d'une structure en bâtonnet interne à la capsidie avait été observée chez un Baculovirus (¹⁹) après action du PTA 10 % ou de la chaleur.

C'est donc la première fois, à notre connaissance, que de telles structures ont pu être isolées, purifiées et caractérisées chez un virus à ADN. Elles paraissent différentes de celles des riboprotéines d'Arbovirus et de Rhabdovirus précédemment décrites [(¹⁴), (¹⁵), (¹⁶)].

Par électrophorèse en gel de polyacrilamide (²⁰) de suspensions de virus dégradés, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une protéine basique dont la vitesse de migration se situe entre celle des histones et des protamines. Il paraît probable qu'il s'agisse de la protéine associée à l'ADN dans la structure nucléoprotéique.

Les images obtenues par dégradation ménagée de la protéine constituant la nucléoprotéine, rendent possible l'étude de la configuration de la molécule d'ADN qui mesure 40 μ dans la structure nucléoprotéique. Ce travail est actuellement en cours. Les dimensions respectives de la nucléoprotéine et de la capsidie permettent d'envisager des possibilités d'organisation de la nucléocapsidie virale.

L'obtention, lors de la purification des nucléoprotéines, de fractions très enrichies en enveloppes ou en protéines d'origine capsidie, devrait permettre de rapporter à des structures précises un certain nombre de protéines constitutives de la particule virale. La possibilité de purification de quantités importantes de la protéine liée à l'ADN ouvre, en outre, des voies d'études en ce qui concerne les interactions ADN-protéines.

(*) Séance du 22 septembre 1975.

Travail réalisé dans le cadre d'un programme FAO.

(1) A. HUGER, *Z. Angew. Entomol.*, 72, 1972, p. 309.

(2) B. ZELAZNY, *J. Invert. Pathol.*, 22, 1973, p. 122 et 359.

(3) C. HAMMES, *Cah. ORSTOM*, série Biol., 21, 1974, p. 90.

(4) P. MONSARRAT, *Cah. ORSTOM*, série Biol., 21, 1974, p. 91.

(5) P. MONSARRAT, J.-L. DUTHOIT et C. VAGO, *Comptes rendus*, 278, Série D, 1974, p. 3259.

(6) P. MONSARRAT, G. MEYNADIER, G. CROIZIER et C. VAGO, *Comptes rendus*, 276, Série D, 1973, p. 2077.

(7) J. M. QUIOT, P. MONSARRAT, G. MEYNADIER et C. VAGO, *Comptes rendus*, 276, Série D, 1973, p. 3229.

(8) P. MONSARRAT, J. C. VEYRUNES, G. MEYNADIER, G. CROIZIER et C. VAGO, *Comptes rendus*, 277, Série D, 1973, p. 1413.

(9) B. REVET et P. MONSARRAT, *Comptes rendus*, 278, Série D, 1974, p. 331.

(10) C. PAYNE, *J. Gen. Virol.*, 25, 1974, p. 105.

(11) G. CROIZIER et P. MONSARRAT, *Entomophaga*, 19, 1974, p. 115.

(12) P. MONSARRAT et J. C. VEYRUNES, *J. Invertebr. Pathol.* (sous presse).

(13) J. DUBOCHET, M. DUCOMMUN, M. ZOLLINGER et E. KELLENBERGER, *J. Ultrastr. Res.*, 35, 1971, p. 147.

- (14) K. HUMMELER, in : *Comparative Virology*, K. Maramorosch et E. Kurstak, Academic Press, 1971, p. 361.
- (15) R. F. PETERSSON et C. H. VON BONSDORFF, *J. of. Virol.*, 15, 2, 1975, p. 386.
- (16) A. SAMCO, M. BOULOY et C. HANNOUN, *Comptes rendus*, 280, Série D, 1975, p. 779.
- (17) C. VAGO, *Rev. de Path. Veg. et Ent. Agr. de Fr.*, 43 (4), 1964, p. 237.
- (18) M. B. PONSEN, *Neth. J. Plant. Path.*, 71, 1965, p. 54.
- (19) N. G. SHVEDCHIKOVA, B. P. ULANOV et L. M. TARASEVITCH, *Vopz. Virusol. URSS*, 5, 1968, p. 631.
- (20) S. PANYIM et R. CHALKLEY, *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 1969, p. 337.

ORSTOM, 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy ;
Station de Recherches de Cytopathologie,
INRA-CNRS, 30380 Saint-Christol ;
Institut de Recherches sur le Cancer,
avenue Paul-Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif ;
Equipe de Recherches n° 140 du CNRS-USTL,
34060 Montpellier Cedex.