

1. PRESENTATION DES ORBIVIRUS

La résolution de la structure d'un virus à l'échelle atomique peut permettre de mieux comprendre au niveau moléculaire son mécanisme d'infection, de réplication et d'assemblage. La finalité de ces recherches est de concevoir des vaccins synthétiques, possédant les caractéristiques structurales du virus et susceptibles de déclencher une réponse immunitaire appropriée.

Le travail effectué dans le groupe au Laboratory of Molecular Biophysics d'Oxford, UK, sous la direction de David Stuart a permis de déterminer en 1998 la structure de la nucléocapside (**core**) du virus de la fièvre catharrale maligne du mouton (**bluetongue virus**, BTV), qui appartient au genre *orbivirus* de la famille des *Reoviridae*. Ce genre compte également african horsesickness virus (AHSV) et epizootic-hemorrhagic disease virus (EHDV). Les orbivirus sont transmis par des insectes (*Culicoïdes*) et infectent les ruminants des régions tropicales et subtropicales, causant de graves dégâts économiques. Ils ont un diamètre de 800 Å, un poids moléculaire de 100 millions de Dalton et la résolution de leur structure représente un véritable défi cristallographique.

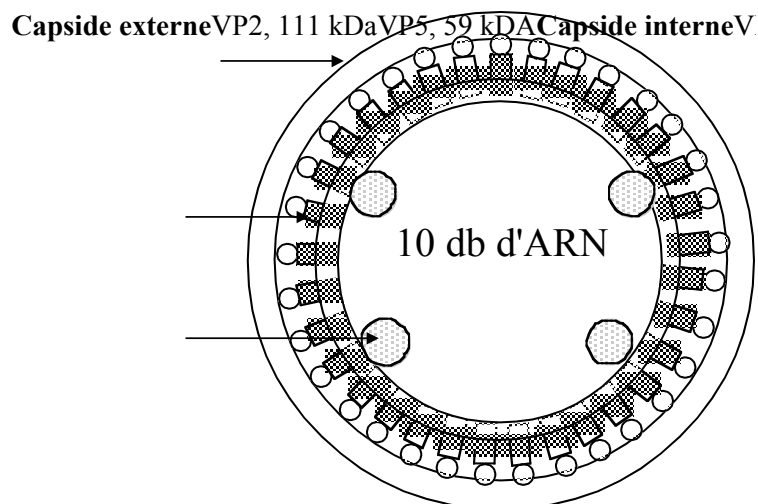


Figure 1. Schéma de coupe d'un orbivirus.

Les orbivirus sont constitués d'une double enveloppe protéique de symétrie icosaédrique enfermant un génome de 10 ARN double brin. Chaque ARN code pour une protéine virale. L'enveloppe externe est formée d'un arrangement de protéines structurales appelées VP2 et VP5 (**figure 1**). L'enveloppe interne de diamètre 700 Å est constituée des protéines VP3 et VP7. Le tout enferme l'ARN génomique et un complexe polymérase constitué des protéines VP1, 4 et 6. Trois des protéines codées, NS1, 2 et 3, ne sont pas structurales.

2. RESOLUTION DE LA STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DU CORE DU BTV

2.1 résolution de la structure cristallographique de VP7

La résolution cristallographique d'une structure virale se fait généralement pas à pas. La structure individuelle d'une des protéines de capsid est obtenue en premier. Cette structure pourra être placée dans des cartes de reconstruction de microscopie électronique, afin de générer un modèle de la capsid pour l'ensemble des protéines de même type. Ce modèle sera ensuite utilisé pour résoudre le problème des phases par la méthode du remplacement moléculaire, après avoir enregistré des données rayons X sur des cristaux du virus entier.

La structure de la protéine de capsid VP7 de BTV a ainsi été résolue par la méthode des dérivés lourds à 2,6 Å de résolution. Il s'agit d'un trimère de 3 x 349 résidus, constitué d'un domaine inférieur en hélices α et d'un domaine supérieur en brins β (**figure 2**). Le domaine inférieur est posé sur la couche de VP3 dans le virus entier, tandis que le domaine supérieur supporte la capsid externe.



Figure 2. Tracé C α du trimère de BTV VP7. Les monomères sont représentés en mode ruban, avec un jeu de couleur allant du bleu pour la partie N-terminale au rouge pour la partie C-terminale.

2.2 La résolution de la nucléocapsid du bluetongue virus

Des cristaux des nucléocapsides des sérotypes 1 et 10 du BTV ont été obtenus. Le terme nucléocapsid désigne le virus sauvage sans sa capsid externe (**figure 1**). Le sérotype 1 est isolé en Afrique du Sud, le 10 des USA. Les nucléocapsides des deux sérotypes sont fortement homologues (plus de 90% d'identité de séquence protéique), mais elles cristallisent dans des groupes d'espace différents : P2₁2₁2 pour BTV-1 avec pour paramètres de maille a = 796 Å, b = 825 Å, c = 756 Å ; P4₁2₁2 pour BTV-10 avec a = b = 1 115 Å, c = 1 584

Å. Les cristaux du BTV-1 contiennent 1/2 nucléocapside dans l'unité asymétrique, ceux du BTV-10 une nucléocapside entière. Ces cristaux renferment le génome du virus et sont potentiellement infectieux. Aussi, leur cristallisation est-elle réalisée par l'équipe de Peter Mertens dans un environnement de niveau de sécurité P3, à l'Institut for Animal Health (IAH), Pirbright, UK. Les cristaux sont montés sur place dans des capillaires de verre scellés et amenés sur les sites de rayonnement synchrotron sous la responsabilité d'agents de sécurité. Les cristaux en capillaire sont refroidis à 4°C pendant l'enregistrement. Ils sont fragiles et seulement deux ou trois images de diffraction sont obtenues par cristal. Un jeu complet avec une bonne résolution (inférieure à 6 Å) nécessite l'emploi de centaines de cristaux. Les données synchrotron ont ainsi été enregistrées au cours de nombreux voyages à Daresbury, UK, et à Grenoble sur la ligne haute brillance de l'ESRF. Les cristaux du BTV-1 peuvent diffracter jusqu'à une résolution de 3,5 Å, ceux du BTV-10 jusqu'à 6,5 Å.

La structure de la nucléocapside du BTV-1 a été résolue en premier par la méthode du remplacement moléculaire. La reconstruction de la capsid de VP7 a été prise comme modèle (**figure 3**). La capsid interne est formée de 780 monomères de VP7, arrangés selon un réseau quasi équivalent T=13I. De nombreux cycles d'affinement ont permis d'homogénéiser les cartes de densité électronique, en utilisant 30 opérateurs de symétrie non-cristallographique. La structure de la deuxième protéine de capsid, VP3, est ainsi apparue et un modèle pratiquement entier de cette protéine a été construit. VP3 est constituée de trois domaines susceptibles de pivoter, permettant à la capsid virale d'être constituée de 120 monomères répartis suivant un pseudo réseau T=2. La structure de BTV-1 a servi de modèle pour résoudre celle de BTV-10 par remplacement moléculaire. Des cartes moyennées très semblables à celles du BTV-1 ont été obtenues.

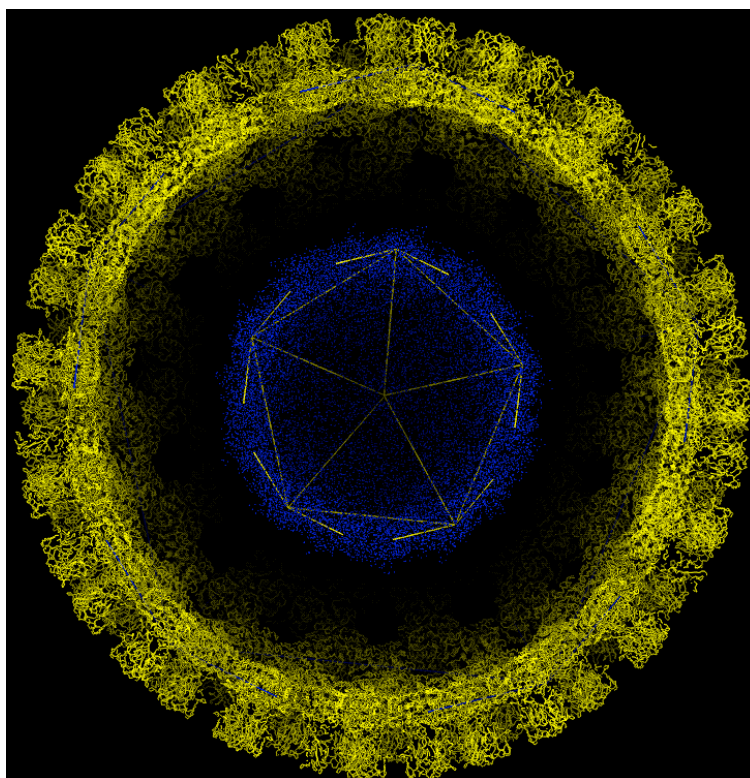


Figure 3. Arrangement en jaune de la protéine VP7 dans la capsid interne du bluetongue virus. Une vue de coupe de la structure atomique du virus de la fièvre aphteuse, l'une des plus grosses structures atomiques résolues dans les années 80, est superposée en bleu.

Les formes structurales des complexes polymérase constitués de VP1, 4 et 6, de même que celles de l'ARN viral sont apparues à l'intérieur des capsides de BTV-1 et BTV-10, au cours du calcul des cartes de densité électronique obtenues à une résolution de 7-6 Å. Ces complexes macromoléculaires ne peuvent obéir à la symétrie icosaédrique, car ils ne sont pas présents en un multiple de 60 dans le virus. Leurs structures atomiques ne pourront donc jamais être observées dans des cristaux de virus. Ils sont toutefois suffisamment ordonnés pour être visible dans des cartes moyennées à basse résolution et un modèle tridimensionnel de l'ARNdb a été construit (**figure 4**).

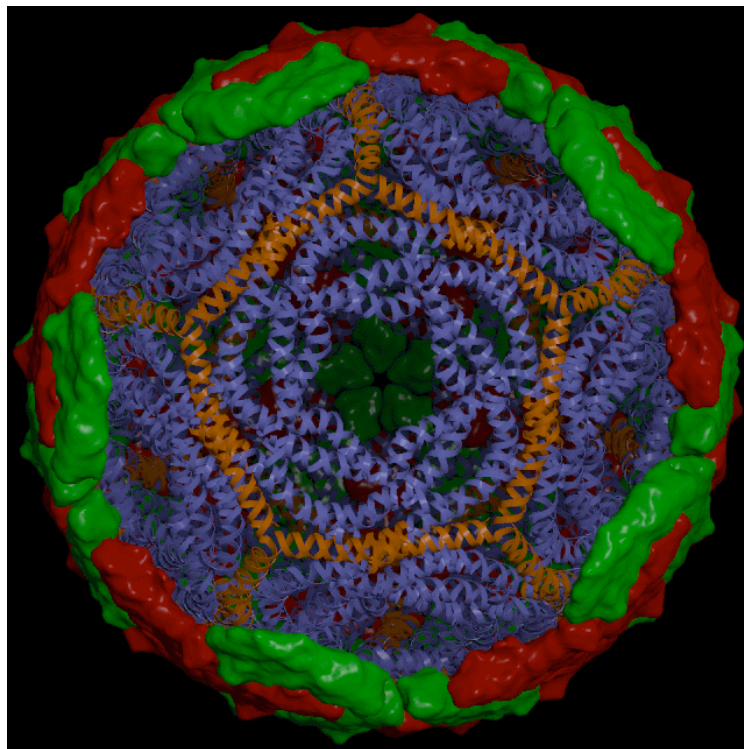


Figure 4. Modèle du repliement de l'ARN double brin sous la couche VP3 de la capsid interne.
L'ARNdb s'arrange en spirale autour des axes 5 icosaédriques.

Celui-ci représente 80% des 19 000 paires de bases du génome viral. Il montre que chaque double brin d'ARN est susceptible de s'enrouler autour des complexes polymérase, le long des axes icosaédriques de symétrie 5. Un segment d'ARNdb pourrait ainsi s'étager en spirale sur quatre niveaux. Cette architecture est vraisemblablement commune à l'ensemble des *Reoviridae*.