



HAL
open science

Etude structurale des virus par cryo-microscopie électronique

Guy Schoehn

► **To cite this version:**

Guy Schoehn. Etude structurale des virus par cryo-microscopie électronique. Biologie structurale [q-bio.BM]. Université Joseph fourier, 2008. tel-01306606

HAL Id: tel-01306606

<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-01306606>

Submitted on 25 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier de Grenoble

**HABILITATION A DIRIGER
DES RECHERCHES**

Etude structurale des virus par cryo-microscopie électronique

Guy SCOEHN

Chargé de recherche au CNRS

Soutenance 14 mars 2008

10h salle de séminaire IBS

Jury

Pr Pierre Boulanger

Dr Andrea Dessen

Dr Jean Lepault

Pr Rob Ruigrok

Pr Eva Pebay-Peyroula

Biologie structurale des interactions entre virus et cellule hôte

UMR 5233 (UJF/EMBL/CNRS)

6, rue Jules Horowitz

38041 Grenoble Cedex 9

Institut de Biologie Structurale Jean Pierre Ebel

UMR5075 (CEA-CNRS-UJF)

41, avenue des Martyrs

38027 Grenoble cedex 1

Remerciements

SOMMAIRE

Première partie – Présentation du candidat	
Curriculum vitae	P 5
Synopsis de carrière	P 8
Deuxième partie – Production scientifique	P 14
Publications	P 15
Encadrement	P 23
Enseignements et fonctions	P 24
Troisième partie – Exposé des travaux principaux	P 25
PRÉAMBULE	P 26
A : LES VIRUS À ARN NÉGATIFS	P 27
1- Nucléocapside recombinante du virus de la rage	P 27
2- Structure de la nucléocapside recombinante du virus de la rougeole	P 31
3- Perspectives	P 34
B - L'ADÉNOVIRUS HUMAIN	P 35
1- Généralités sur les adénovirus	P 35
a- <i>Structure</i>	P 36
b- <i>Les étapes précoces de l'infection</i>	P 38
<i>Les récepteurs adénoviraux</i>	
<i>Les vecteurs adénoviraux</i>	
c- <i>Les dodécaèdres de l'adénovirus</i>	P 40
<i>Géométrie</i>	
<i>Historique</i>	
<i>Sérotypes et dodécamérisation</i>	
2- Résultats	
a- <i>Le dodécaèdre</i>	P 42
b- <i>Structure cristalline des pentons de l'adénovirus</i>	P 48
c- <i>L'adénovirus entier</i>	P 48
3- Projet : Compréhension de la structure des adénovirus	P51
RÉFÉRENCES	P 54

PREMIÈRE PARTIE

PRÉSENTATION DU CANDIDAT

Curriculum, Synopsis de carrière

CURRICULUM VITAE

Guy SCHOEHN

Né le 10 décembre 1968 à Mulhouse

Vie maritale, 3 enfants

20, rue Georges Maeder

38170 Seyssinet-Pariset

Tél. : 04 76 62 03 59

Chercheur en Biophysique

Spécialité : Microscopie électronique

Biologie structurale des interactions entre virus et cellule hôte

UVHCI UMR 5233 (UJF/EMBL/CNRS)

schoehn@embl.fr

FORMATION ET DIPLÔMES

2005-.... **Chargé de recherche de classe 1** CNRS section 21

2006 : médaille de bronze section 21 CNRS

2001-2005 **Chargé de recherche de classe 2** CNRS section 21

1999-2001 **Stage Post Doctoral** sous la direction du Dr R.H.W. Ruigrok.

Sujet : Étude structurale par cryomicroscopie électronique de la nucléocapside des virus à ARN négatif.

European Molecular Biology Laboratory Grenoble Oustation, France.

1998-1999 **Stage Post Doctoral** sous la direction du Pr. Helen Saibil.

Sujet : Étude structurale par cryomicroscopie électronique et analyse d'images de chaperonnes moléculaires des Archaeabactéries.

Département de Cristallographie, Birkbeck College, Londres, Royaume-Uni.

1994-1998 **Doctorat de Physique** option RMN et Cristallographie Biologiques sous la direction du Dr E.A. Hewat. Mention Très Honorable avec les félicitations du jury.

Sujet : Reconstructions tridimensionnelles de virus icosaédriques par cryomicroscopie électronique. Application au virus Broadhaven et à l'adénovirus humain de sérotype 3.

Laboratoire de Microscopie Electronique Structurale, Institut de Biologie Structurale J-P Ebel, Grenoble.

J'ai bénéficié pour la préparation de ma thèse d'une bourse d'une durée de trois ans accordée par le Ministère de la Recherche et de la Technologie.

J'ai obtenu le Prix Pierre Favard 1998 décerné par la Société Française des Microscopies et qui récompense la meilleure thèse en microscopie des années 1997-1998.

1993-1994 **Diplôme d'études Approfondies (D.E.A.)** Cristallographie et RMN biologiques : mention Assez Bien.

Sujet : Détermination de la structure d'un Réovirus de Guêpe par cryomicroscopie électronique.

Laboratoire de Microscopie Electronique Structurale, Institut de Biologie Structurale J-P Ebel, Grenoble.

FONCTIONS

1994 – 1997 Bourse du ministère de la recherche (MRT)

1998 – 1999 Stage postdoctoral (Welcome Trust)

1999 – 2001 Stage postdoctoral (EMBL)

2001 – 2005 Chargé de Recherche 2^{ème} classe au CNRS

Depuis 2005 **Chargé de Recherche 1^{ère} classe depuis Octobre 2005**

Rapporteur pour les revues « EMBO Journal » « Virology Journal »

Membre du comité scientifique d'évaluation 2006 de l'unité UMR 6026 « Interactions Cellulaires et Moléculaires » de Rennes.

Membre de la commission de spécialistes « biologie » section 64 de l'UJF.

FINANCEMENTS

2004 Obtention d'un BQR Université Joseph Fourier (50,000 €)

2006 Obtention d'une ANR jeune chercheur 3 ans (150,000 €)

DIFFUSION DES CONNAISSANCES

Auteur de 52 publications internationales

Auteur d'une publication francophone

Auteur/ co-auteur de 2 chapitres de livre

Présentations orales dans 3 congrès internationaux

Co-organisateur et orateur invité dans 7 workshops internationaux (5 EMBO, 1 ESRF et 1 SOLEIL).

Enseignement de la microscopie électronique et de l'analyse d'images en 2^{ème} et 3^{ème} cycle universitaire depuis 1999.

PRIX ET DISTINCTIONS

1998 : **Prix Pierre Favard 1998** décerné par la Société Française des Microscopies et qui récompense la meilleure thèse de microscopie des années 1997-1998.

2006 : **Médaille de bronze section 21 CNRS**

SYNOPSIS DE CARRIÈRE

Septembre 1993 – Septembre 1994

DEA de Cristallographie et RMN biologiques, Université de Grenoble.

Sous la direction d'Elizabeth Hewat, groupe de Richard Wade.

Institut de Biologie Structurale J-P Ebel, Grenoble.

Détermination de la structure d'un Réovirus de Guêpe par cryomicroscopie électronique.

Cette année de DEA m'a permis d'avoir un premier contact avec la microscopie électronique et la cryomicroscopie électronique. Je me suis également initié à l'analyse informatique des images de virus obtenues par cryomicroscopie (20 particules virales sur un Zeiss EM 109 modifié pour la cryomicroscopie électronique) ce qui a débouché sur l'obtention d'une structure tridimensionnelle du virus de guêpe à 45 Å de résolution. Cette étude a confirmé l'appartenance de ce virus à la famille des Reoviridae.

Acquis du DEA :

- [Microscopie électronique et cryomicroscopie électronique](#)
- [Analyse d'images de virus icosaédriques](#)

Octobre 1994 – janvier 1998

Doctorat de Physique, Université de Grenoble

Sous la direction d'Elizabeth Hewat, groupe de Richard Wade

Institut de Biologie Structurale J-P Ebel, Grenoble

Reconstructions tridimensionnelles de virus icosaédriques par cryomicroscopie électronique. Application au virus Broadhaven et à l'adénovirus humain de sérotype 3.

Je me suis intéressé à deux types de virus icosaédriques : l'adénovirus humain et le virus Broadhaven.

L'étude de l'adénovirus humain a été réalisée dans le cadre d'une collaboration avec un autre étudiant en thèse à l'IBS. En effet, j'ai pu avoir accès à des échantillons purifiés de deux sous-particules virales (les protéines formant les sommets de certains adénovirus peuvent en effet s'auto-assembler par douze en dodécaèdres avec ou sans fibres). Après microscopie électronique et analyse des images de ces deux types de particules, j'ai obtenu deux reconstructions à 25 et 30 Å de résolution (Schoehn et al., 1996) et j'ai déduit les modalités suivant lesquelles ces deux protéines interagissent.

Le deuxième virus que j'ai étudié est le virus Broadhaven, un virus à ARN double brin appartenant à la famille des Reoviridae et infectant les oiseaux de mer par l'intermédiaire d'une tique. Cette étude s'est faite en collaboration avec un groupe d'Oxford. J'ai, dans ce cas, mis en pratique les techniques de culture cellulaire et de production de virus apprises lors d'un séjour en Angleterre. Par la suite, j'ai produit et purifié moi-même ce virus en infectant des cellules de mammifères à Grenoble. Une fois purifié, j'ai étudié ce virus par microscopie électronique et j'ai recalculé sa structure tridimensionnelle. J'ai comparé cette structure, à 23 Å de résolution, avec celle d'un autre virus de la même famille : le virus de la fièvre catharale du mouton ou Bluetongue virus. Cette étude a montré que des différences d'immunogénicité entre ces deux virus pouvaient être directement mises en relation avec les différences structurales observées (Schoehn et al., 1997).

Acquis de la thèse :

- Microscopie électronique et cryomicroscopie électronique
- Analyse d'images de virus icosaédriques résolution 20-25 Å
- Culture cellulaire et production, purification de virus
- Collaboration étroite avec un membre de l'IBS (étudiant en thèse)
- 4 publications

Janvier 1998 - Février 1999

Post-doctorant. Bourse Welcome trust

Sous la direction du Pr Helen Saibil

Département de Cristallographie, Birkbeck College, Londres, Royaume-Uni.

Étude structurale par cryomicroscopie électronique et analyse d'images de chaperonnes moléculaires des Archaeobactéries.

Mon travail a porté sur la détermination de la structure tridimensionnelle des chaperonnes d'archaeobactéries thermophiles : TF55 (*Sulfolobus shibatae*) et thermosome (*Thermoplasma acidophilum*) grâce à des études de cryoME couplées aux techniques d'analyse d'images de particules isolées. Ces chaperonnes sont équivalentes au système GroEl-Es des bactéries. Pour la première fois, nous avons montré l'existence pour les deux types de chaperonnes thermophiles, de 3 conformations différentes : une forme doublement ouverte (équivalente à la chaperonne GroEl), une forme doublement fermée (équivalente à la structure cristallographique du thermosome) et une structure avec un côté fermé et l'autre ouvert (équivalente au complexe GroEl-Es mais qui n'avait encore jamais été mis en évidence chez les archaea) (Schoehn et al., 2000a et b). De plus, dans le cas du thermosome nous avons réussi à placer manuellement la structure à résolution atomique dans les enveloppes tridimensionnelles obtenues par microscopie électronique. Ce positionnement a été fait en considérant que la protéine était constituée de 3 domaines pouvant bouger les uns par rapport aux autres mais dont la structure interne ne change pas (rigid-body movement). Ce travail a amélioré les connaissances sur les chaperonnes des archaeobactéries et montré que, si les symétries et les séquences des chaperonnes des archaeobactéries sont différentes de celles des chaperonnes bactériennes (symétrie D8 ou D9 comparé à D7), les cycles de changements de conformations permettant un sauvetage des protéines mal repliées sont très similaires.

Acquis du 1^{er} stage postdoctoral :

- Microscopie électronique et cryomicroscopie électronique sur d'autres types de microscopes
- Analyse d'images de particules isolées
- Séparation par analyse d'images de plusieurs espèces oligomériques présentes dans un même échantillon
- Première combinaison de données microscopie et cristallographique (manuelle)
- Séjour à l'étranger
- 2 publications

Février 1999 - Septembre 2001

Post-doctorant. Bourse EMBL

Sous la direction du Pr Rob Ruigrok

European Molecular Biology Laboratory Grenoble Outstation, Grenoble, France.

Étude structurale par cryomicroscopie électronique de la nucléocapside des virus à ARN négatif.

Les virus à ARN simple brin de polarité négative de l'ordre des *Mononégavirales* sont des virus enveloppés dont l'ARN simple brin est complémentaire de l'ARN messager (ARNm). Cet ARN monocaténaire peut être segmenté ou non. L'ordre des *Mononégavirales* regroupe plusieurs familles de virus qui diffèrent par leurs infectivités, leurs hôtes et leurs structures. Au moins un virus de chaque famille est très connu par les effets qu'il peut avoir sur l'homme. Nous pouvons en particulier citer le virus des oreillons, de la rougeole, de la grippe et de la rage qui sont d'importants pathogènes pour l'homme et qui provoquent chaque année de nombreux décès. Cet Ordre comprend également des virus émergents entraînant un fort taux de mortalité tels que les virus Ebola ou Marbourg.

De manière générale, en 1999, très peu de données structurales étaient disponibles concernant tous ces virus. De manière simpliste, ils sont constitués d'une nucléocapside dans laquelle protéines et ARN interagissent fortement, d'une protéine de matrice présente en un grand nombre de copies qui maintient l'intégrité du virus et semble impliquée dans le bourgeonnement du virus et d'une bicouche lipidique dans laquelle sont insérées les spicules qui reconnaissent les récepteurs cellulaires lors de l'infection. Nous nous intéressons à ces virus et en particulier à la structure de leur nucléocapside et de leur protéine de matrice.

La première étape de la réplication de ces virus est la transcription de l'ARN viral de polarité négative (ARNv) en ARNm grâce à une ARN polymérase – ARN dépendante virale. Cette polymérase s'associe à une structure particulière : la matrice N-ARNv où l'ARNv est associé à la nucléoprotéine virale (N) pour former la nucléocapside. La nucléoprotéine doit non seulement protéger l'ARNv mais également permettre sa transcription. Malgré le rôle central de cette nucléoprotéine dans le cycle viral, aucune donnée structurale la concernant n'existait. Mon projet consistait à étudier la structure des nucléoprotéines des virus de la rage, VSV, de la rougeole et du virus de Marbourg.

Le deuxième élément clé d'un cycle viral est l'assemblage et le bourgeonnement des virus. Comme ces étapes sont généralement induites par les protéines de matrice, nous nous sommes intéressés aux protéines de la matrice du virus Ebola (collaboration avec le Dr Winfried Weissenhorn de l'EMBL). Nous avons étudié en particulier l'oligomérisation de cette protéine et son association avec les membranes lipidiques chargées négativement (Dessen et al., 2000 ; Ruigrok et al., 2000 ; Scianimanico et al., 2000 ; Timmins et al., 2001, 2003 a et b ; Nguyen et al., 2005). Je ne développerais pas cette partie.

Les virus que nous avons étudié n'ont pas, à priori, une très grande régularité structurale ; de ce fait l'analyse par cryomicroscopie électronique (qui nécessite de moyenner plusieurs milliers d'images) n'était donc pas triviale. Nous avons choisi de résoudre ce problème en suivant le même cheminement que la cristallographie aux rayons X : Nous isolons les différentes protéines du virus pour essayer de construire des objets plus réguliers. Cette méthode fonctionne plutôt bien dans notre cas car ces protéines possèdent une forte affinité entre elles et ont tendance à former des objets réguliers (anneaux ou hélices). Nous avons appliqué cette technique aux nucléoprotéines du virus de la rage et de la rougeole. Ces études ont été poursuivies après mon recrutement par le CNRS et seront donc exposées plus en détail dans la partie « exposé des travaux principaux ».

Acquis du 2^{er} stage postdoctoral :

- Analyse d'images de particules hélicoïdales
- Séparation par analyse d'images de plusieurs espèces dans un même échantillon
- Nouvelles techniques de préparation (cryo-coloration négative)
- Environnement international très compétitif (EMBL)
- Nombreuses collaborations sur des sujets très différents
- 9 publications

Octobre 2001 – Septembre 2005

Chargé de recherche 2^{ème} classe au CNRS

Institut de Biologie Structurale de Grenoble (détaché à l'EMBL Grenoble)

Acquis des dernières années de recherche

- Encadrement de deux étudiants en DEA/ MASTER 2 (2003 Aurélie Albertini 50 % ; 2004 Céline Fabry 100%)

- Encadrement de deux étudiantes en thèse (2005 - ... Céline Fabry, Majida El Bakkouri, directeur des travaux)
- 8 Publications avec deux étudiantes (Schoehn et al., 2008, Schoehn et al., 2006, Fuschiotti et al., 2006, Albertini et al., 2006a et b, Fabry et al., 2005, Albertini et al., 2005, Schoehn et al., 2004)
- Obtention d'une bourse de thèse de la région pour Majida El Bakkouri
- Résolution nanométrique pour les reconstructions tridimensionnelles obtenues
- Utilisation d'un microscope FEG
- Combinaison des données cristallographiques – microscopie
- Responsable de deux microscopes électroniques (EMBL, IBS)

Depuis Septembre 2005

Chargé de recherche 1^{ère} classe au CNRS

Institut de Virologie Moléculaire et Structurale FRE2854 qui est devenu UMR 5233 (UJF/EMBL/CNRS) «Biologie structurale des interactions entre virus et cellule hôte» depuis le 1er janvier 2006. Depuis septembre 2007, je travaille plus souvent à l'Institut de Biologie Structurale où j'ai pris en charge la partie expérimentale du laboratoire de microscopie électronique (trois microscopes, une technicienne). Ceci est une première étape vers la création d'une équipe commune de microscopie électronique entre l'IBS et l'UVHCI. J'essaye actuellement de faire le même travail initié par Rob Ruigrok et que j'ai continué à l'EMBL : promouvoir une utilisation plus systématique de la microscopie électronique par les différents groupes de l'IBS.

DEUXIÈME PARTIE

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

Production scientifique, Encadrement, Enseignements, Fonctions

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

2008

- 1 **Schoehn G**, El Bakkouri M, Fabry CCM, Billet O, Estrozi LF, Le L, Curiel DT, Andrey V, Kajava AV, Ruigrok RWH & Kremer EJ. (2008). 3D structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *J Virol* in press.
- 2 Albertini AA, **Schoehn G**, Weissenhorn W, Ruigrok RW. (2008) Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci*. In press
- 3 Fender P, **Schoehn G**, Perron-Sierra F, Tucker GC, Lortat-Jacob H. (2008) Adenovirus dodecahedron cell attachment and entry are mediated by heparan sulfate and integrins and vary along the cell cycle. *Virology*. 371(1):155-64.
- 4 Erlich P, Cesbron JY, Lemaire-Vieille C, Curt A, Andrieu JP, **Schoehn G**, Jamin M, Gagnon J. (2008) PrP N-terminal domain triggers PrP(Sc)-like aggregation of Dpl. *Biochem Biophys Res Commun*. 365(3):478-83.

2007

- 5 Torreira E, **Schoehn G**, Fernández Y, Jorba N, Ruigrok RW, Cusack S, Ortín J, Llorca O. (2007) Three-dimensional model for the isolated recombinant influenza virus polymerase heterotrimer. *Nucleic Acids Res* 35(11):3774-83.
- 6 Albertini A.A.V., Clapier C.R., Wernimont A.K., **Schoehn G**, Weissenhorn W. and Ruigrok R.W.H. (2007). Isolation and crystallization of a unique size category of recombinant Rabies virus Nucleoprotein–RNA rings. *J. Struct. Biol* 158(1):129-33.
- 7 Fernández-Tornero, C., Böttcher, B., Riva, M., Carles, C., Steuerwald, U., Ruigrok, R.W.H., Sentenac, A., Müller, C.W. and **Schoehn G** (2007). Insights into transcription

initiation and termination from the electron microscopy structure of yeast RNA polymerase III. *Mol. Cell*, **5(6)**:813-23.

- 8 Albertini AA, Clapier CR, Wernimont AK, **Schoehn G**, Weissenhorn W, Ruigrok RW. (2006) Isolation and crystallization of a unique size category of recombinant Rabies virus Nucleoprotein-RNA rings. *J Struct Biol*. **158(1)**:129-33.

2006

- 9 **Schoehn G***, Vellieux FMD, Dura MA, Receveur-Brechot V, Fabry CMS, Ruigrok RWH, Ebel C, Roussel A, Franzetti B, (2006). An archeal peptidase assembles into two different quaternary structures: a tetrahedron and a giant octahedron. *J Biol Chem*. **281(47)**:36327-37. * **les trois premiers auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail**
- 10 Fuschiotti P, Fender P, **Schoehn G**, Conway JF. (2006). Development of the dodecahedral penton particle from adenovirus 3 for therapeutic application. *J Gen Virol*. **87**:2901-5.
- 11 Albertini AA, Wernimont AK, Muziol T, Ravelli RB, Clapier CR, **Schoehn G**, Weissenhorn W, Ruigrok RW (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*. **313(5785)**:360-3.
- 12 Faure J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, **Schoehn G**, Goldberg Y, Boyer V, Kirchhoff F, Raposo G, Garin J, Sadoul R. (2006). Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci*. **31(4)**:642-8.
- 13 Fuschiotti P, **Schoehn G**, Fender P, Fabry CM, Hewat EA, Chroboczek J, Ruigrok RW, Conway JF.(2006) Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol*. **356(2)**:510-20.

2005

14 Hong SS, Szolajska E, **Schoehn G***, Franqueville L, Susanna Myhre S, Lindholm L, Rob W.H. Ruigrok RWH, Boulanger P and Chroboczek J. (2005) The 100K-chaperone protein from Adenovirus serotype 2 (subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses. *J Mol Biol* ; **352(1)** : 125-38.

***les trois premiers auteurs ont contribué de manière équivalente à ce travail**

15 Nguyen TL, **Schoehn G**, Weissenhorn W, Hermone AR, Burnett JC Panchal RG, McGrath C, Zaharevitz DW, Aman MJ, Gussio R, Bavari S (2005) An all-atom model of the pore-like structure of hexameric VP40 from Ebola: Structural insights into the monomer–hexamer transition. *J Struct. Biol.* **151(1)** : 30-40.

16 Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW, **Schoehn G**. (2005) A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J.* ; **24** : 1645-54.

17 Dura MA, Receveur-Brechot V, Andrieu JP, Ebel C, **Schoehn G**, Roussel A, Franzetti B. (2005) Characterization of a TET-like aminopeptidase Complex from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry* ; **44(9)** : 3477-86.

18 Zubieta C, **Schoehn G**, Chroboczek J, Cusack S. (2005). The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell.* **17(1)** : 121-35.

19 Papanikolopoulou K, **Schoehn G**, Forge V, Forsyth VT, Riekkel C, Hernandez JF, Ruigrok RW, Mitraki A. (2005). Amyloid fibril formation from sequences of a natural beta-structured fibrous protein, the adenovirus fiber. *J. Biol. Chem.* **280(4)** : 2481-90.

2004

20 Petosa C, **Schoehn G**, Askjaer P, Bauer U, Moulin M, Steuerwald U, Soler-Lopez M, Baudin F, Mattaj IW, Muller CW. (2004). Architecture of CRM1/Exportin1 suggests

how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell.* **16(5)** : 761-75.

- 21 Sola M, Bavro VN, Timmins J, Franz T, Ricard-Blum S, **Schoehn G**, Ruigrok RW, Paarmann I, Saiyed T, O'Sullivan GA, Schmitt B, Betz H, Weissenhorn W. (2004) Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *EMBO J.* ; **23(13)** : 2510-9.
- 22 **Schoehn G**, Mavrakis M, Albertini A, Wade R, Hoenger A, Ruigrok RW. (2004) The 12 A structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J Mol Biol.* ; **339(2)** : 301-12.

2003

- 23 **Schoehn G.**, Di Guilmi AN., Lemaire D., Attree I., Weissenhorn W. and Dessen A. (2003) Oligomerization of PopB and PopD precede membrane insertion of ring-like pores in the type III secretion system of *Pseudomonas*. *EMBO J.* ; **22**:4957-67.
- 24 Thomassen E., Gielen G., Schütz M., **Schoehn G.**, Abrahams JP., Miller S. and van Raaij MJ. The structure of the receptor-binding domain of the bacteriophage T4 short tail fibre reveals a knitted trimeric metal-binding fold. (2003) *J Mol Biol* ; **331** : 361-73.
- 25 Timmins J., **Schoehn G.**, Kohlhaas C., Klenk HD, Ruigrok RWH, and Weissenhorn W. (2003) Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40. *Virology* ; **312** : 359-68.
- 26 Fender P, **Schoehn G**, Foucaud-Gamen J, Gout E, Garcel A, Drouet E, Chroboczek J.(2003) Adenovirus dodecahedron allows large multimeric protein transduction in human cells. *J Virol.* ; **77** : 4960-4.
- 27 Balakireva L, **Schoehn G**, Thouvenin E, Chroboczek J. (2003) Binding of adenovirus capsid to dipalmitoyl phosphatidylcholine provides a novel pathway for virus entry. *J Virol.* ; **77** : 4858-66.

- 28 Heikinheimo P, Helland R, Leiros HK, Leiros I, Karlsen S, Evjen G, Ravelli R, **Schoehn G**, Ruigrok R, Tollersrud OK, McSweeney S, Hough E. (2003) The structure of bovine lysosomal alpha-mannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation. *J Mol Biol.* ; **327**:631-44.
- 29 Mavrakakis M, Iseni F, Mazza C, **Schoehn G**, Ebel C, Gentzel M, Franz T, Ruigrok RW. (2003) Isolation and characterisation of the rabies virus N degrees-P complex produced in insect cells. *Virology* ; **305** : 406-14.
- 30 Timmins J, **Schoehn G**, Ricard-Blum S, Scianimanico S, Vernet T, Ruigrok RW, Weissenhorn W. (2003) Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol.* ; **326** : 493-502.

2002

- 31 Buisson M, Hernandez JF, Lascoux D, **Schoehn G**, Forest E, Arlaud G, Seigneurin JM, Ruigrok RW, Burmeister WP. (2002) The crystal structure of the Epstein-Barr virus protease shows rearrangement of the processed C terminus. *J Mol Biol.* ; **324** : 89-103.
- 32 Mollinari C, Kleman JP, Jiang W, **Schoehn G**, Hunter T, Margolis RL. (2002) PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol.* ; **157(7)** : 1175-86.
- 33 Mavrakakis M, Kolesnikova L, **Schoehn G**, Becker S, Ruigrok RW. (2002) Morphology of Marburg virus NP-RNA. *Virology* ; **296(2)** : 300-7.
- 34 Franzetti B, **Schoehn G**, Hernandez JF, Jaquinod M, Ruigrok RW, Zaccai G. (2002) Tetrahedral aminopeptidase: a novel large protease complex from archaea. *EMBO J.* ; **21(9)** : 2132-8.
- 35 Franzetti B, **Schoehn G**, Garcia D, Ruigrok RWH, Zaccai G. (2002) Characterization of the proteasome from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Archaea* ; **1** : 53-61.

36 Favier AL, **Schoehn G**, Jaquinod M, Harsi C, Chroboczek J. (2002) Structural studies of human enteric adenovirus type 41. *Virology* ; **293(1)** : 75-85.

2001

37 van Raaij MJ, **Schoehn G**, Burda MR, Miller S. (2001) Crystal structure of a heat and protease-stable part of the bacteriophage T4 short tail fibre. *J Mol Biol.* ; **314(5)** : 1137-46.

38 van Raaij MJ, **Schoehn G**, Jaquinod M, Ashman K, Burda MR, Miller S. (2001) Identification and crystallisation of a heat- and protease-stable fragment of the bacteriophage T4 short tail fibre. *Biol Chem.* ; **382(7)** : 1049-55.

39 Franzetti B, **Schoehn G**, Ebel C, Gagnon J, Ruigrok RW, Zaccari G. (2001) Characterization of a novel complex from halophilic archaeobacteria, which displays chaperone-like activities in vitro. *J Biol Chem.*; **276(32)** : 29906-14.

40 Durmort C, Stehlin C, **Schoehn G**, Mitraki A, Drouet E, Cusack S, Burmeister WP. (2001) Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus. *Virology* ; **285(2)** : 302-12.

41 Timmins J., Scianimanico S., **Schoehn G**. and Weissenhorn W. (2001). Vesicular Release of Ebola Virus Matrix Protein VP40. *Virology*. **283**, 1-6.

42 Thouvenin E., **Schoehn G**., Rey f., Petitpas I., Mathieu M., Vaney M-C., Cohen J. Kohli E., Pothier P. and Hewat E.A. (2001). Antibody inhibition of the transcriptase activity of the rotavirus DLP : a structural view. *J. Mol. Biol.* **307**, 161-172.

43 **Schoehn G**., Iseni F., Mavrakakis M., Blondel D. and Ruigrok R.W.H. (2001). Structure of recombinant rabies virus N-RNA and identification of the phosphoprotein binding site. *J. Virol.* **75**, 490-498.

2000

- 44 * Scianimanico S., **Schoehn G.**, Timmins J., Ruigrok R.H.W., Klenk, H.D. and Weissenhorn W. (2000). Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *EMBO J.* **19**, 6732-6741. * **Scianimanico S. et Schoehn G. sont premiers co-auteurs.**
- 45 Bal H.P., Chroboczek J., **Schoehn G.**, Ruigrok R.W.H. and Dewhurst S. (2000). Adenovirus type 7 penton. Purification of soluble pentamers from *Escherichia coli* and development of an integrin-dependent gene delivery system. *Eur. J. Biochem.* **267**, 6074-6081.
- 46 Balakirev M., **Schoehn G.** and Chroboczek J. (2000). Lipoic acid-derived amphiphiles for redox-controlled DNA delivery. *Chem. Biol.*, **7**, 813-819.
- 47 **Schoehn G.**, Hayes M., Cliff M., Clarke A.R. and Saibil H.R. (2000). Domains rotations between open, closed and bullet shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin. *J. Mol. Biol.*, **301**, 323-332.
- 48 Ruigrok R.W., **Schoehn G.**, Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D. and Weissenhorn W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.*, **300**, 103-112.
- 49 **Schoehn G.**, Quate-Randall E., Jimenez J.L., Joachimiak A. and Saibil H.R. (2000). Three conformations of an archeal chaperonin, TF55 from *Sulfolobus shibatae*. *J Mol. Biol.*, **296**, 813-819.

1999

- 50 Verdaguer N., **Schoehn G.**, Ochoa W.F., Fita I., Brookes S., King A., Domingo E., Mateu M.G., Stuart D. and Hewat E.A. (1999). Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. *Virology*, **255**, 260-268.

1997

- 51 **Schoehn G.**, Moss S.R., Nuttall P.A. and Hewat E.A. (1997). Structure of Broadhaven virus by cryo-electron microscopy : correlation of structural and antigenic properties of Broadhaven virus and Bluetongue virus outer capsid proteins. *Virology*, **235**, 191-200.

1996

- 52 **Schoehn G.**, Fender P., Chroboczek J. and Hewat E.A. (1996). Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *EMBO J.*, **15**, 6841-6846.

PUBLICATIONS DANS DES REVUES FRANÇAISES

- 53 Albertini AA, **Schoehn G.**, Ruigrok RWH (2005) Structures impliquées dans la réplication et la transcription des virus à ARN non segmenté de sens négatif. *Virologie* **9** : 83-92.

CHAPITRES DE LIVRE

- 54 **Schoehn G** and Ruigrok RWH . Electron microscopy of viruses
- 55 Ruigrok RWH, **Schoehn G**, and Conway J (2005). The morphology and structure of viruses. In : Topley and Wilson-Microbiology and Microbial Infections (B. Mahy and V. Ter Meulen Eds.) Arnold Publishers, London.

ENCADREMENT

J'ai encadré trois d'étudiants de troisième cycle

- 2002-2003 Aurélie Albertini : DEA de biologie structurale : Co-encadrement avec le Pr R Ruigrok (obtention d'une bourse MNRT)
Structure de la nucléocapside du virus Nipah
Publications communes : Albertini et al ., 2005 Virologie
 Schoehn et al., 2004 J Mol Biol
 Albertini et al., 2006 Science
 Albertini et al., 2007 J Struct Biol
 Albertini et al., 2007 Cell Mol Life Sci.
- 2003-2004 Céline Fabry : DEA de biologie structurale (obtention d'une bourse MNRT)
Structure de l'adénovirus)
- 2004-... Céline Fabry ; Majida El Bakkouri : thèses (obtention de bourse MNRT et région Rhône-Alpes) : Directeur de travaux
Publications communes : Fabry et al ., 2005 EMBO J
 Schoehn et al., 2006 JBC
 Fuschiotti et al., 2006 J Mol Biol
 Schoehn et al., 2008
- 2003-2005 Initiation à la microscopie électronique et l'analyse d'images de Carlos Fernández-Tornero (post-doctorant espagnol, groupe du Dr C Mueller EMBL).
Publications communes : Fernández-Tornero et al., 2007 Mol Cell

Depuis septembre 2007 : suivi des travaux du Dr Wai-Li Ling : polymérisation de protéines membranaires sur des nanotubes de carbones. Encadrement et aide à l'interprétation des images de coloration négatives obtenues par Daphna Fenel (technicienne CEA, IBS).

ENSEIGNEMENTS

Depuis 1999, j'ai assuré des enseignements essentiellement sous forme de **cours magistraux en microscopie électronique** en deuxième et troisième cycle universitaire d'une durée de moins de 10 heures par année.

J'ai également participé soit en tant que conférencier invité soit en tant que co-organisateur à plusieurs workshops : 4 EMBO, 1 ESRF et 1 SOLEIL.

Communications orales invitées à des workshops:

- Workshop on Complementary Methods in Structural Biology :

ESRF Grenoble 14-15 Février 2002

- Workshop "Futures directions in synchrotron radiation bio-crystallography" SOLEIL, Gif sur Yvettes 13-14 décembre 2004.
- EMBO workshop on Combination of Electron Microscopy and X-ray Crystallography in Structure Determination 23-29 Octobre 2005.

Organisation et participation active à des Workshops EMBO internationaux

- Structural Characterization of Macromolecular Complexes: Grenoble, 2 -7 Juin 2008.
- Structural Characterization of Macromolecular Complexes: Grenoble, 15 - 20 Mai 2006.
- Structural Characterization of Macromolecular Complexes: Modern Techniques and Strategies, Grenoble, 3 – 8 Mai 2004.
- Crystallization of Macromolecular Complexes: 8 – 13 avril 2002.

FONCTIONS

Rédacteur de projet

En 2004, dans le cadre de la création de l'Institut de Virologie Moléculaire et Structurale, j'ai soumis, sous la tutelle du Pr Rob Ruigrok, un projet de recherche pour une demande de financement Brevet Qualité Recherche à l'Université Joseph Fourier. Ce financement, destiné à équiper l'Institut de Virologie en moyens informatiques a été retenu à hauteur de la demande (50 000 euros).

En 2006, dans le but d'animer une équipe de recherche plus ou moins indépendante sur le thème de l'adénovirus, j'ai soumis un projet ANR jeune chercheur qui a été accepté pour une durée de 3 ans avec une enveloppe de 150 000 euros.

Je participe à la rédaction de projets pour le financement d'un cryo-microscope électronique destiné à la tomographie (RTRA nanosciences ; ANR plateforme ; IBISA)

Rapporteur pour des journaux scientifiques

J'ai été sollicité comme « **rapporteur** » par des journaux internationaux: « EMBO Journal ; Virology Journal » .

Comité scientifique d'évaluation

En 2006, à la demande du CNRS j'ai participé au comité d'évaluation de l'unité UMR 6026 « Interactions Cellulaires et Moléculaires » de Rennes. J'étais plus particulièrement responsable de la partie microscopie électronique.

Commission de spécialistes

Depuis 2007, je fais partie d'une commission de spécialistes biologie de l'Université Joseph Fourier, section 64.

TROISIÈME PARTIE

EXPOSÉ DES TRAVAUX PRINCIPAUX

PRÉAMBULE

Les deux fils conducteurs de mes travaux de recherche sont la microscopie électronique et la virologie structurale, le premier servant d'outil d'étude pour le second. Des progrès très importants ont été effectués en microscopie électronique et analyse d'images depuis une dizaine d'années. Les résultats que j'ai obtenus ont suivi cette progression. D'une résolution moyenne de l'ordre de 30 Å pendant ma thèse j'atteins actuellement des résolutions de l'ordre de 10 Å pour les reconstructions tridimensionnelles. Cette progression a été rendue possible grâce à l'utilisation et à la mise au point du dernier microscope FEG de l'IBS ainsi qu'au progrès de l'informatique (capacité de stockage et vitesse de calcul).

J'ai été recruté par le CNRS dans le cadre de la création de l'Institut de Virologie Moléculaire et Structurale à Grenoble. Je continue de travailler sur les projets initiés pendant mon deuxième stage postdoctoral (virus à ARN négatifs) mais j'ai également repris des projets plus anciens (adénovirus). Je tiens à développer ce dernier projet mais je collabore également avec les groupes de l'EMBL et différents chercheurs de l'IBS. Pour des raisons de lisibilité j'aborderais uniquement les résultats obtenus pour les virus à ARN négatif avant de développer plus longuement la thématique « adénovirus ».

A : LES VIRUS À ARN NÉGATIFS

1- Nucléocapside recombinante N-ARN du virus de la rage

F. Iseni, M. Mavrakis A. Albertini et RWH Ruigrok (EMBL Grenoble, IVMS)

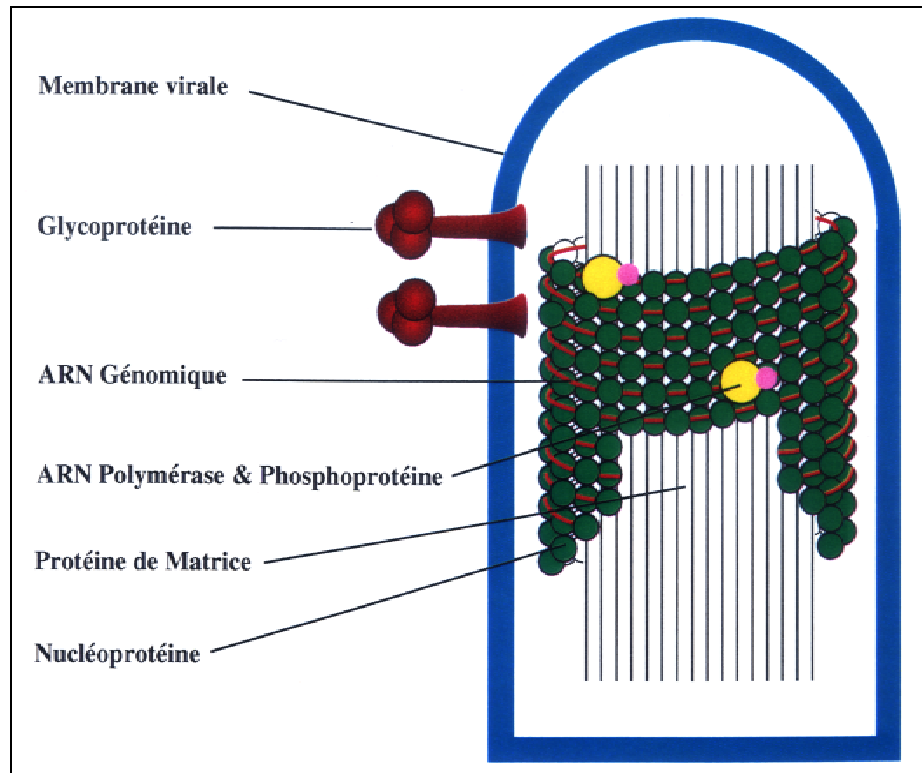


Figure 1 : Structure schématique d'un Rhabdovirus

Le virus de la rage est un Lyssavirus qui appartient à la famille des *Rhabdoviridae*. Sa morphologie est similaire à celle des autres virus de cette famille avec une forme dite « en balle de fusil », une longueur qui peut varier de 180 à 220 nm et un diamètre compris entre 50 et 100 nm (*Figure 1*). Ce virus est mortel pour l'homme si aucun traitement n'est administré tôt après l'infection. Il provoque encore la mort d'environ 50 000 personnes par an (principalement en Inde).

Seule l'ultrastructure de la particule virale est connue (*Figure 1*). L'ARN viral simple brin de polarité négative est entièrement recouvert par la nucléoprotéine N qui est associée avec la polymérase et son cofacteur la phosphoprotéine. Cet ensemble forme la nucléocapside. La position de la protéine de matrice dans le virus reste controversée. Elle serait localisée soit à l'intérieur de la nucléocapside soit juste sous la membrane virale (Barge *et al.*, 1993, Zakowski *et al.*, 1981). Une glycoprotéine trimérique, dont la partie N-terminale

est exposée à la surface du virus, est insérée dans la membrane et interagit avec les protéines internes du virus. Nous avons étudié la nucléocapside du virus de la rage et en particulier son association avec l'ARN_{viral}. Cette nucléoprotéine confère 3 caractéristiques importantes à l'ARN_{viral} :

- N s'associe avec l'ARN_{viral} et empêche la formation de structures secondaires.
- N induit, pour l'ARN qu'elle protège, une résistance aux ribonucléases ce qui suggère une protection du squelette ribose-phosphate.
- N permet une exposition des bases de l'ARN_{viral} pour une reconnaissance et une transcription par la polymérase.

La nucléoprotéine de la rage, exprimée dans le système baculovirus, se fixe aux ARNs monocaténaire des cellules infectées et forme non seulement des structures qui ressemblent aux nucléocapsides virales mais également de petits anneaux formés de 9 à 13 nucléoprotéines (Iseni et al., 1998, *Figure 2*). Les nucléocapsides entières ne sont pas assez régulières pour permettre leur étude directe par analyse d'images. Par contre, les petits anneaux peuvent être purifiés assez facilement sur un gradient de glycérol et les clichés obtenus par cryomicroscopie électronique peuvent être analysés. Nous avons ainsi pu obtenir une structure tridimensionnelle d'un anneau constitué de 10 monomères de nucléoprotéine à la résolution de 28 Å. Cette structure nous a montré comment ces protéines s'agencent entre elles et en particulier qu'il existe 2 contacts entre deux protéines N adjacentes (*Figures 3A, D*). Les protéines N traitées à la trypsine deviennent incapables de fixer le cofacteur P de la polymérase (la partie C-terminale responsable de l'attachement est clivée). Là encore, nous avons obtenu une structure d'un anneau constitué de 10 monomères de nucléoprotéine à une résolution avoisinant les 30 Å (*Figures 3B, E*). La comparaison de ces deux anneaux constitués de nucléoprotéines natives et clivées nous a permis de localiser la partie C-terminale de cette protéine au niveau d'un de ces deux lobes à l'intérieur de l'anneau (*Figure 3G*).



Figure 2 : Morphologie de la nucléocapside « sauvage » du virus de la rage (à gauche) et des nucléocapsides recombinantes exprimées dans Baculovirus (milieu et à droite) observées par microscopie électronique en coloration négative. C'est à l'aide d'anneaux identiques à ceux représentés à droite mais observés par cryomicroscopie électronique que nous avons effectué les reconstructions tridimensionnelles présentées Figure 3.

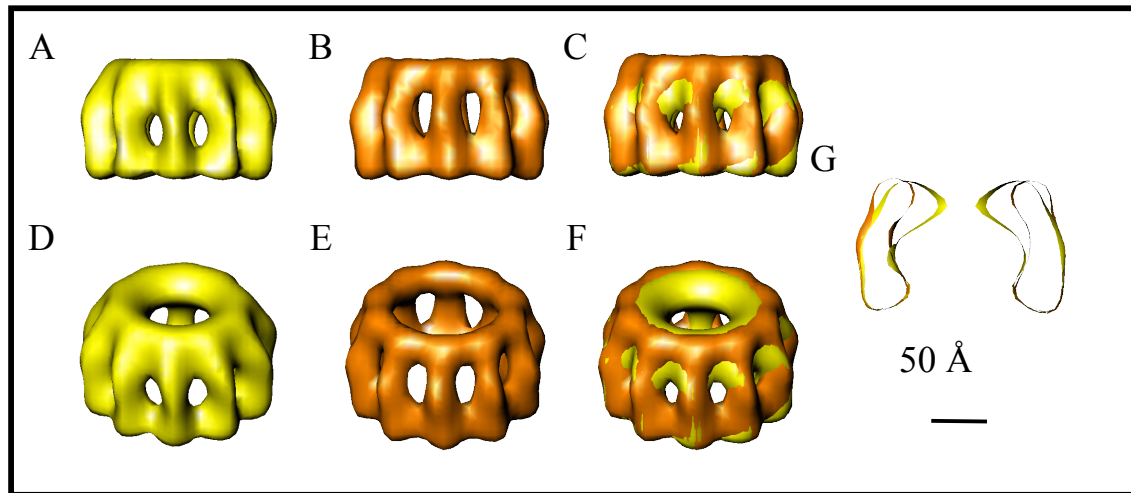


Figure 3 : Reconstructions 3D de la nucléocapside recombinante N-ARN constituée de 10 nucléoprotéines natives (jaune) et digérées (orange). Les complexes sont représentés en vue de côté (A, B et C), légèrement inclinés (D, E et F) et superposés (C et F). Une coupe fine de cette superposition (G) permet de localiser la partie C-terminale au niveau du lobe supérieur de la nucléoprotéine et à l'intérieur de l'anneau.

Nous avons également confirmé l'attachement de la phosphoprotéine P sur l'anneau N-ARN natif (*Figure 4*) et l'absence d'attachement sur l'anneau clivé (non représenté). La *figure 4* prouve que la phosphoprotéine peut se retrouver soit à l'intérieur soit à l'extérieur de l'anneau. La seule localisation possible du site d'attachement de la phosphoprotéine sur la nucléoprotéine doit donc être située à l'extrémité d'un des deux lobes de la nucléoprotéine. Cette localisation est en accord avec les expériences de digestion de la partie C-terminale de la nucléoprotéine responsable de l'attachement de la phosphoprotéine (voir *Figure 3*).

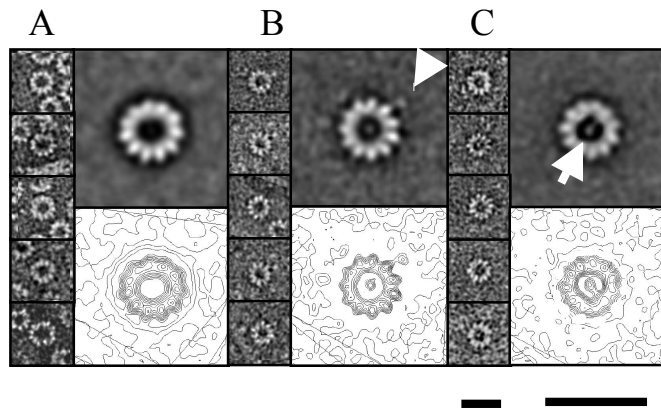


Figure 4 : Visualisation de la phosphoprotéine P attachée sur la nucléocapside recombinante N-ARN observée par microscopie électronique en coloration négative. La figure 4A montre un anneau recombinant N-ARN constitué de 11 nucléoprotéines sans phosphoprotéine. Les figures 4B et C montrent des anneaux N-ARN recombinants composés de 11 nucléoprotéines en complexe avec la phosphoprotéine fixée dessus. Cette phosphoprotéine P peut soit se retrouver à l'intérieur de l'anneau soit à l'extérieur (flèche). La liaison de la phosphoprotéine à la nucléoprotéine semble donc être flexible. La barre d'échelle représente 200 Å.

Grâce à la connaissance de la structure de la protéine N et des contacts qu'elle forme avec ces voisins nous avons pu créer un modèle de la nucléocapside entière de la rage (Schoehn et al., 2001). Ces études ont été poursuivies depuis 2001. Deux problèmes avaient limité la résolution de nos reconstructions. D'une part, nous n'avions que très peu de vues de côté de ces anneaux dans les images collectées (condition indispensable pour obtenir une reconstruction 3D de bonne qualité). D'autre part, l'échantillon était composé d'un mélange de plusieurs espèces oligomériques différentes. Le second problème a été résolu par la technique d'électrophorèse préparative en gel natif. Cette technique permet en effet de séparer des complexes macromoléculaires ayant des poids moléculaires proches. En l'appliquant aux anneaux de la nucléoprotéine de la rage, nous avons réussi à séparer les anneaux à 9, 10, 11 et 12 monomères (Albertini et al., 2006b). Finalement les préparations obtenues étaient tellement homogènes en taille que nous avons obtenu des cristaux et résolu la structure de ces anneaux à l'échelle atomique (Albertini et al., 2006a). Cette structure cristallographique (*Figure 5*) est parfaitement similaire à la structure basse résolution obtenue par microscopie électronique et a permis de confirmer nos hypothèses quant à la localisation de la partie C-terminale de la nucléoprotéine responsable de l'interaction avec la phosphoprotéine.

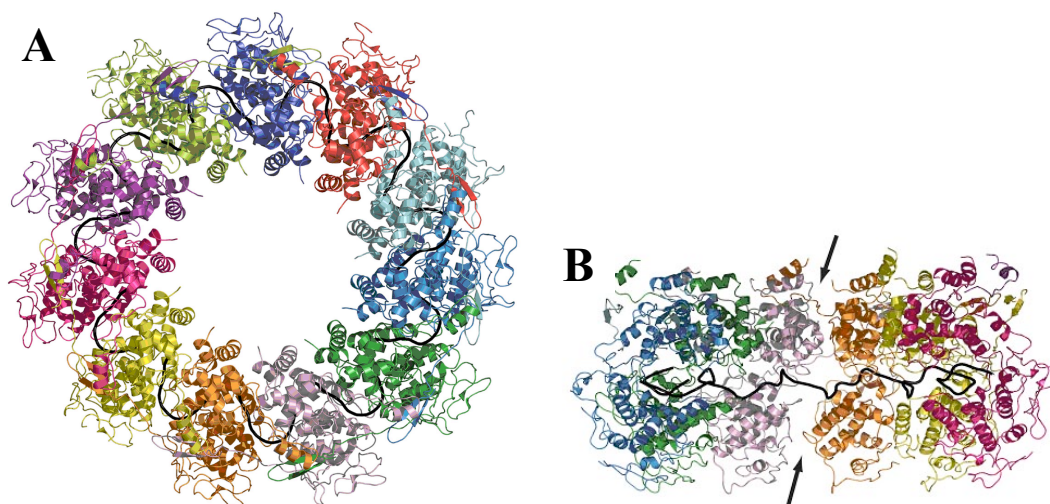


Figure 5 : Structure cristallographique d'un anneau de onze sous-unités de N-ARN du virus de la rouge exprimé grâce au système Baculovirus. Chacun des monomères de N est en couleur différente et l'ARN est représenté en noir. La vue de côté B est dans la même orientation que dans la Figure 3.

2- Structure de la nucléocapside recombinante du virus de rougeole

M. Mavrakis, RWH Ruigrok (EMBL Grenoble) Fabian Wild (Lyon)

Le virus de la rougeole est un Mononegavirales, de la famille des *Paramyxoviridae*. La nucléoprotéine N de la rougeole a été exprimée dans le système Baculovirus par Manos Mavrakis (étudiant en thèse à l'EMBL) à partir d'un clone fourni par le Dr Fabian WILD (Lyon). Ces complexes N-ARN ne sont pas assez rigides pour réaliser directement une reconstruction 3D à partir d'images de cryomicroscopie électronique (*Figure 6, gauche*). Par contre, après digestion à la trypsine de la partie C-terminale de cette protéine, nous avons obtenu des complexes rectilignes qui semblaient plus ordonnés aussi bien en coloration négative qu'en cryomicroscopie électronique (*Figure 6, droite*).

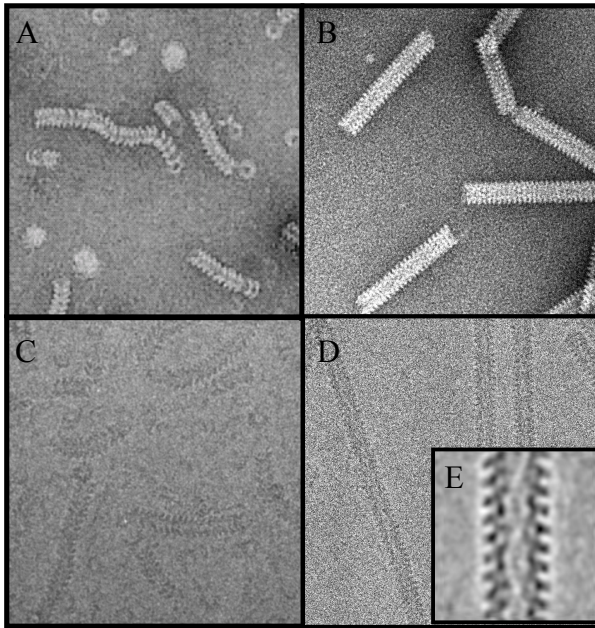


Figure 6 : Nucléocapsides recombinantes du virus de la rougeole observées par microscopie électronique

A : Matrice N-ARN du virus de la rougeole exprimée dans Baculovirus avant digestion visualisée par coloration négative.

B : Matrice N-ARN du virus de la rougeole exprimée dans Baculovirus après digestion visualisée par coloration négative.

C : Matrice N-ARN du virus de la rougeole exprimée dans Baculovirus avant digestion visualisée par cryomicroscopie électronique.

D : Matrice N-ARN du virus de la rougeole exprimée dans Baculovirus après digestion visualisée par cryomicroscopie électronique.

E : Moyenne de plusieurs hélices issues de D.

Malheureusement ces images n'étaient pas directement exploitables : l'ordre était surtout présent le long de l'axe du tube mais le nombre de sous unités protéiques par tour ne semblait pas totalement régulier (spectre de puissance anisotropique). Les méthodes d'analyses des objets hélicoïdaux ne pouvaient donc pas s'appliquer. J'ai donc développé une méthode d'analyse d'images mixte. Les tubes sont « découpés » en petits morceaux qui sont alignés les uns par rapport aux autres pour être ensuite moyennés (méthode d'analyse des objets isolés). Ces moyennes qui sont beaucoup plus régulières ont été par la suite traitées grâce aux méthodes d'analyses d'images hélicoïdales. La reconstruction tridimensionnelle finale de ces particules montre une résolution variant de 17 à 25 Å (17 selon l'axe du tube, 25 selon l'axe perpendiculaire au tube) (*Figure 7, gauche*).

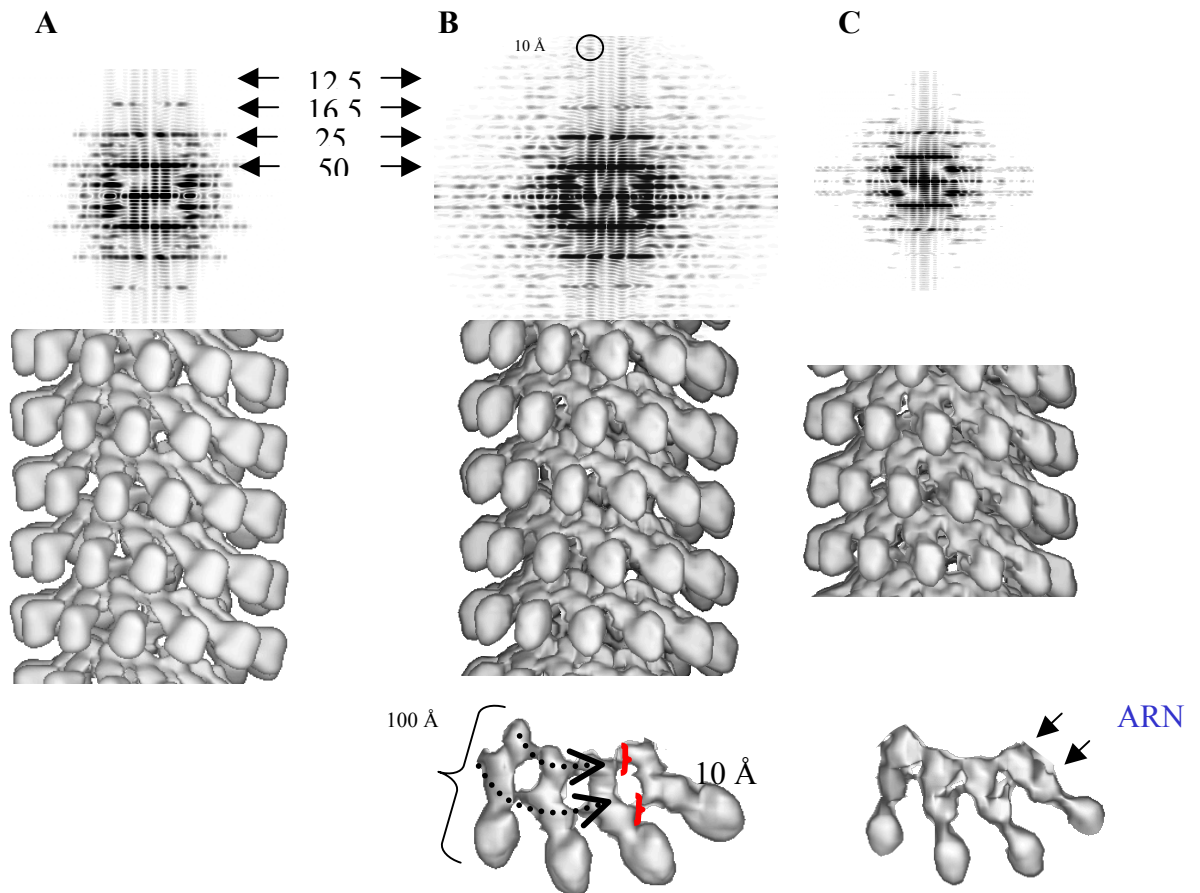


Figure 7 : La nucléocapside digérée du virus de la rougeole.

La figure montre de gauche à droite les reconstructions tridimensionnelles et les spectres de puissance d'une reprojction de ces structures (en haut) obtenues par différentes méthodes :

A - Reconstruction tridimensionnelle obtenue avec la méthode mixte (particule isolée/hélicoïdale) : Résolution 15-20 Å

B - Reconstruction tridimensionnelle obtenue avec la méthode « Egelman » : Résolution 10-12Å. La partie inférieure de la figure montre les nucléoprotéines vues de dessus avec les connexions qu'elles établissent entre elles. Les dimensions sont indiquées en angströms.

C - Reconstruction tridimensionnelle de la nucléocapside + Cis-platine obtenue avec la méthode « Egelman ». : Résolution 15-20 Å. La partie inférieure montre quatre nucléoprotéines vues de dessus.

Vue la qualité des images obtenues par microscopie électronique (fonction de transfert de contraste montrant la présence d'information jusqu'à une résolution d'environ 10 Å), ce résultat semblait décevant et j'ai donc décidé d'améliorer la reconstruction obtenue en utilisant une nouvelle technique d'analyse d'images de complexes hélicoïdaux (Egelman, 2000). Cette dernière m'a permis d'atteindre la limite de résolution des images (10-12 Å) (*Figure 7, milieu*).

Parallèlement nous avons essayé de localiser l'ARN dans ces complexes. Nous avons pour cela utilisé du cis-platinum qui crée des pontages au sein de l'acide nucléique. Les reconstructions obtenues montrent qu'il existe bien une zone de densité supplémentaire (le cis-platinum c'est bien fixé) vers l'intérieur de l'hélice mais que cette zone était trop diffuse pour être catégorique quant à la localisation exacte de l'ARN (*Figure 7, droite*) (Schoehn et al., 2004).

Depuis la fin de ce travail, la structure cristallographique de la nucléoprotéine du virus de la rage a été déterminée (voir *figure 5*). Néanmoins, même si les séquences primaires des nucléoprotéines du virus de la rage et du virus de la rougeole sont très différentes, notre hypothèse quant à la localisation de l'ARN au sein de la nucléoprotéine du virus de la rougeole est en accord avec la localisation de l'ARN mise en évidence dans la structure de la nucléoprotéine du virus de la rage.

3- Perspectives pour les travaux sur la structure des nucléocapsides des virus à ARN négatifs

Je continue de travailler sur d'autres nucléocapsides de virus à ARN négatifs (virus Ebola en particulier) mais parallèlement à cela, une autre microscopiste vient de rejoindre notre groupe. Elle reprend progressivement la partie pratique concernant la détermination et la compréhension de la structure des nucléocapsides des virus à ARN négatifs.

B - L'ADÉNOVIRUS HUMAIN

Mon travail sur les adénovirus humains a débuté en 1995. Parmi mes différents projets, il constitue mon sujet de recherche principal pour lequel j'ai obtenu un financement par l'intermédiaire d'une ANR Jeunes Chercheurs. Ces travaux se font en collaboration avec les docteurs Chroboczek et Fender de l'IBS, Cusack de l'EMBL Grenoble, Kremer de Montpellier, Boulanger de Lyon et Greber de Zurich. Ils ont porté et portent sur les adénovirus humains de sérotypes 2, 3, 5, 7 et 41, sur l'adénovirus canin de sérotype 2 et sur le virus aviaire Celv. Les pentons de ces virus nous intéressent tout particulièrement.

1 - Généralités sur les adénovirus

Les adénovirus (Ad) ont été identifiés en 1953 à partir d'amygdales d'enfants malades (Rowe et al., 1953). Ces virus peuvent infecter les mammifères (Mastadénovirus), les oiseaux (Aviadénovirus) et les animaux à sang froid (Atadénovirus ou les Siadénovirus) (Davison, Benko, and Harrach, 2003). Chez l'homme, la cinquantaine de sérotypes répertoriés a été subdivisée en six sous-groupes de A à F, selon des critères biochimiques, antigéniques, génétiques et structuraux. Les sérotypes les plus étudiés sont l'adénovirus de sérotype 2 (Ad2), l'adénovirus de sérotype 5 (Ad5 : utilisé en thérapie génique) et l'adénovirus de sérotype 3 (Ad3). L'Ad2 et l'Ad5 appartiennent au sous-groupe C, l'Ad3 appartient quant à lui au sous-groupe B.

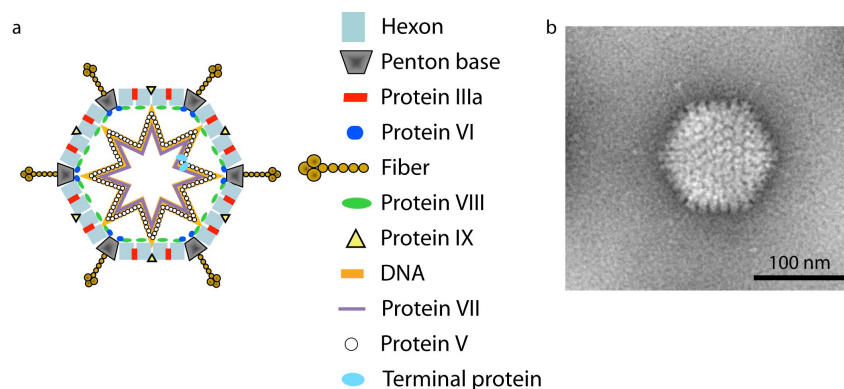


Figure 8 : L'adénovirus

a - Vue schématique d'un adénovirus.

b - Adénovirus humain de sérotype 41 observé en coloration négative. On peut noter la présence de fibres de deux tailles différentes sur un même virus.

a- Structure

D'un point de vue structural, les adénovirus sont des virus de grande taille (90 nm de diamètre) à symétrie icosaédrique pseudo T=25 contenant de l'ADN. Leur capsid possède 20 facettes triangulaires composées de 240 copies d'une protéine trimérique à base hexagonale appelée l'hexon (Stewart et al., 1991, 1993). Une protéine pentamérique, la base du penton, forme les sommets de l'icosaèdre et interagit de façon non-covalente avec une autre protéine trimérique : la fibre. Le complexe formé par la base du penton et la fibre est appelé le penton (*Figure 8*). Ces pentons sont extrêmement importants pour les adénovirus car ils concentrent les sites impliqués dans la reconnaissance cellulaire et dans l'internalisation du virus (voir paragraphe étapes précoces de l'infection). Le reste de la capsid (coque) virale est constitué par les protéines mineures. Ces protéines, au nombre de quatre, se retrouvent associées à la capsid soit du côté externe soit du côté interne. Ces protéines sont appelées IIIa, VI, VIII et IX. Aucune structure cristallographique n'est actuellement disponible pour ces protéines. Les seules informations disponibles sont issues d'études par microscopie électronique. La localisation de ces protéines sera développée plus loin.

L'hexon

Les hexons forment les facettes de l'adénovirus (*Figure 8*). Les structures atomiques des hexons de l'adénovirus 2 et de l'adénovirus 5 ont été résolues (Athappilly et al., 1994 ; Roberts et al., 1986, Rux and Burnett, 2000). Chacun des monomères de l'hexon est formé de deux tonneaux de huit feuillets β . Les trimères sont ainsi formés de six tonneaux dont l'organisation va donner naissance à la base hexagonale de l'hexon. Trois longues extensions émergent de ces tonneaux pour donner naissance aux trois tourelles qui caractérisent le haut des hexons. Plusieurs boucles, trop flexibles, situées dans la partie supérieure de ces hexons n'étaient pas visibles dans les structures atomiques résolues (voir *Figure 17*).

Le penton

Le penton forme les sommets de la capsid virale. Il est constitué par l'association non covalente de la base du penton (pentamérique) et de la fibre (trimérique) (*Figure 9A*). La base du penton est un pentamère de 5 x 571 amino-acides pour Ad2 et de 5 x 544 pour Ad3 dont la structure n'a été déterminée qu'en 2005 (voir figure 13 et Zubieta et al., 2005). La fibre est un long et fin homotrimère qui se projette vers l'extérieur du virus (*Figure 9B*). Sa partie N-terminale est très conservée entre les sérotypes et interagit avec la base du penton. Suit ensuite une tige de longueur variable selon les sérotypes. Cette variation provient du

nombre différent de domaines structuraux répétés constituant cette tige (Green et al., 1983). Ainsi, la fibre de l'Ad3 contient 9 éléments répétés et présente une longueur d'environ 16 nm alors que celle de l'Ad2 qui en contient 22 atteint une longueur d'environ 37 nm (Ruigrok et al., 1990). Finalement, la partie C-terminale de la fibre (20 kDa) se replie sous forme globulaire pour former la tête de la fibre responsable de la reconnaissance primaire des cellules (*Figure 9C*).

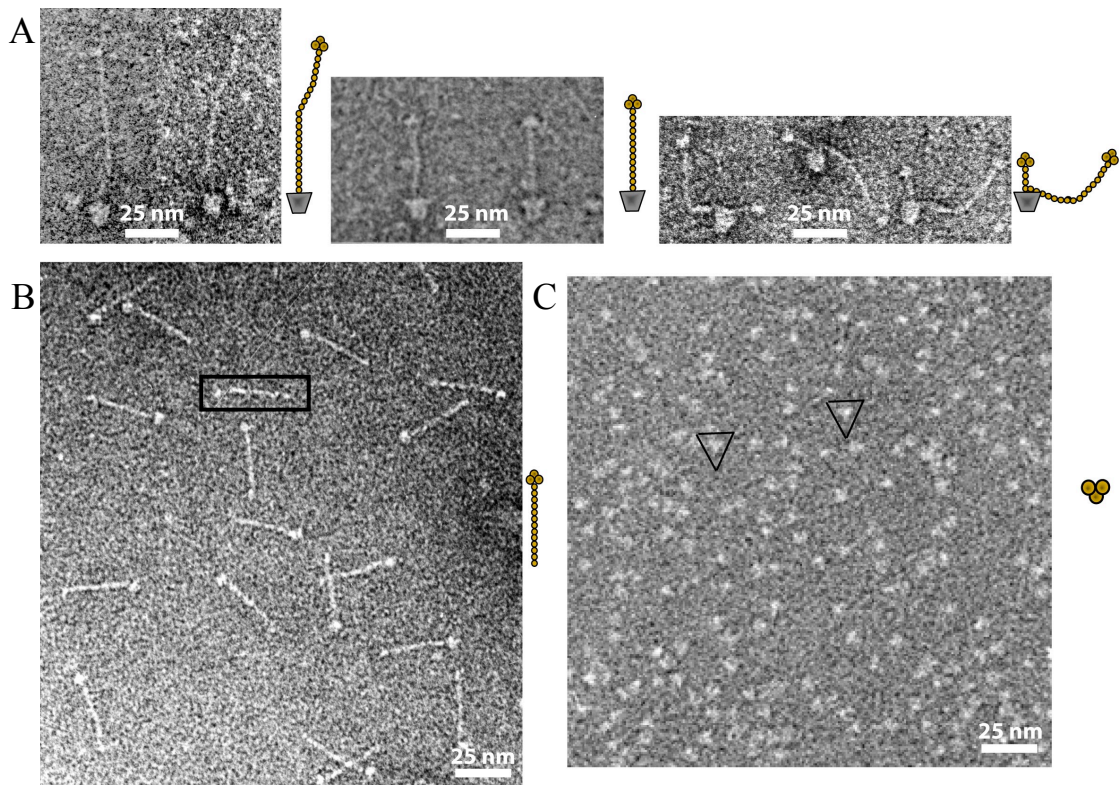


Figure 9 : Le penton des adénovirus

A - Vues détaillées par microscopie électronique de pentons de différents adénovirus. De gauche à droite sont représentés les pentons des adénovirus bovin, adénovirus humain de sérotype 5 et adénovirus aviaire (deux fibres par base).

B –Fibres isolées de l'adénovirus humain de sérotype 2 observées par coloration négative.

C – Partie tête (C-terminal) de la fibre de l'adénovirus canin de sérotype 2 .Les triangles mettent en évidence la nature trimérique de ces têtes.

Depuis quelques années, les structures de plusieurs têtes de fibre ont été résolues par cristallographie aux rayons X (Ad5 (Xia et al., 1994), Ad2 (van Raaij et al., 1999a), Ad12 (Bewley et al., 1999), Ad 3 (Durmort et al., 2001), Ad37 et 19p (Burmeister et al., 2004) et la fibre courte de l'Ad41 (Seiradake & Cusack, 2005)). Chaque monomère de tête de fibre est

constitué d'un arrangement anti-parallèle de sandwich de feuillets β (2 x 4 feuillets accolés avec un angle de 30 degrés). La partie la plus variable de ces structures étant représentée par les boucles qui relient ces différents feuillets β . Une partie de la structure de la fibre a également été déterminée (van Raaij et al., 1999b). Celle-ci est organisée en une triple spirale b β constituée par une répétition de 15 résidus.

b - Les étapes précoces de l'infection

En 1995, lorsque j'ai commencé mon travail de recherche sur les adénovirus en collaboration avec le Dr Jadwidja Chroboczek et Pascal Fender, un certain nombre d'éléments essentiels concernant l'adénovirus n'était pas connu. En particulier, aucun récepteur cellulaire des adénovirus n'avait été identifié. Seules deux publications décrivaient la présence d'une séquence « RGD » conservées dans la plupart des bases du penton des sérotypes adénoviraux humains (à l'exception du sous-groupe F : Ad40 et Ad41). Cette séquence, responsable de la reconnaissance des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ cellulaires, induisait l'internalisation du virus (Belin et Boulanger, 1993; Wickham et al., 1993). C'est également seulement en 1993 que le « déshabillage » progressif du virus à l'intérieur de la cellule et le transport de son génome vers le noyau avaient été disséqués (Greber et al., 1993). Ce processus met en jeu l'endocytose du virus par des vésicules à clathrines, un relargage très précoce de la fibre et de la base du penton (10 et 20 minutes respectivement) au cours de l'acidification de ces vésicules et une « endosomolyse » rapide permettant au génome viral d'aller vers les pores nucléaires *via* les microtubules en une quarantaine de minutes. Il est à noter que pour les adénovirus du sous-groupe B comme l'Ad3, ce mécanisme est très différent de celui du sous-groupe C comme l'Ad2 ou l'Ad5 (*Figure 10*). Les adénovirus du sous-groupe B sont en effet incapables de se libérer des endosomes et suivent donc la voie lysosomiale (Miyazawa et al., 1999). Cependant, si le temps nécessaire aux virus du sous-groupe B pour délivrer leur information génétique dans les noyaux est nettement supérieur (entre 2 et 8 heures), leur efficacité répliquative est comparable.

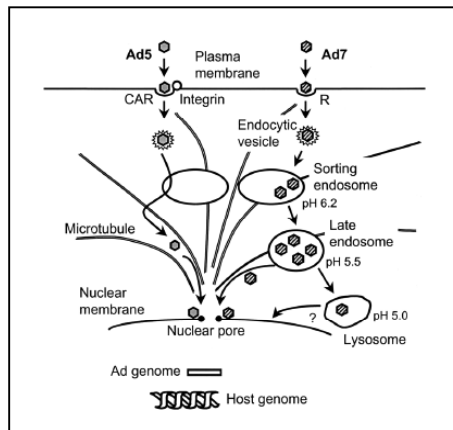


Figure 10 : Schéma présentant les chemins d'endocytose respectivement suivis par les adénovirus du sous-groupe C (Ad5) et du sous-groupe B (Ad7). D'après Miyazawa et al., 1999.

Les récepteurs adénoviraux

Les premiers récepteurs adénoviraux ont été identifiés en 1997. Ainsi, il a été montré que le domaine $\alpha 2$ du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) interagissait avec les domaines globulaires de la fibre de l'Ad5 (Hong et al., 1997). De manière simultanée, un autre récepteur, commun au virus cocksackie et à l'adénovirus, nommé CAR pour Cocksackie and Adenovirus Receptor a été identifié (Bergelson et al., 1997). A l'exception du sous groupe B (Ad3), CAR semble être le récepteur le plus utilisé par les sérotypes humains (Roelvink et al., 1998). Ceci explique la différence de tropisme des sérotypes appartenant au sous-groupe B ainsi que le changement de chemin intracellulaire décrit ci-dessus (Figure 10) (Miyazawa, Crystal, and Leopold, 2001; Miyazawa et al., 1999).

Plus récemment, un nouveau type de récepteur a été décrit pour l'Ad2, les « héparane sulfate protéoglycanes » (HSPG) (Dechecchi et al., 2001; Dechecchi et al., 2000). L'interaction virus-HSPG est responsable de l'internalisation de 50% de l'Ad2 sur des cellules épithéliales en culture et n'est pas sensible à l'ajout de CAR soluble. L'interaction entre ces récepteurs portant des chaînes d'oligosaccharides fortement sulfatés et la fibre n'interviendrait non pas au niveau du domaine globulaire de celle-ci mais sur sa tige. La fibre de l'Ad3 qui possède une tige plus courte et plus rigide (Wu et al., 2003) n'interagit pas avec les HSPG (Dechecchi et al., 2000).

En ce qui concerne le sous-groupe B, la nature des récepteurs est plus complexe et a nécessité une sous-classification des sérotypes en B1 et B2. Les sérotypes appartenant à B1

reconnaissent un récepteur unique alors que ceux du groupe B2 reconnaissent ce même récepteur plus un récepteur additionnel (Segerman et al., 2003a). Plusieurs groupes ont identifié de façon concomitante CD46 comme étant le récepteur de certains sérotypes du sous-groupe B (Gaggar, Shayakhmetov, and Lieber, 2003; Segerman et al., 2003b; Sirena et al., 2004). Une incertitude persiste toutefois pour l'Ad3 (sous groupe B1), car deux travaux contradictoires le concernant ont été publiés (Sirena et al., 2004 ; Marttila et al., 2005). Des molécules exprimées à la surface des lymphocytes B et des cellules dendritiques matures telles que CD80 et CD86 peuvent également servir de récepteurs pour le sous groupe B (Short et al., 2004; Zhang and Bergelson, 2005). Récemment, la structure cristallographique d'un complexe entre CD46 et la tête de l'adénovirus 11 a été publiée (Persson et al., 2007) confirmant ainsi que CD46 est un récepteur du sous-groupe B2.

Les vecteurs adénoviraux

Du fait de leur facilité de production à haut titre et de leur grande efficacité de pénétration dans les cellules, les adénovirus sont des vecteurs de choix pour l'apport d'ADN à des fins biotechnologiques ou thérapeutiques. Je ne détaillerai pas leur production et les différentes générations d'adénovirus recombinants existantes. Du point de vue structural le développement de ces vecteurs a facilité leur étude : ils sont en effet produits à grande échelle et sous forme non répliquative donc inoffensive pour l'expérimentateur. L'étude structurale de ces virus peut, en échange, permettre de mieux les comprendre pour mieux pouvoir les utiliser.

c- Les dodécaèdres de l'adénovirus

Géométrie

D'un point de vue purement historique, le dodécaèdre est un des cinq solides de Platon avec l'icosaèdre, le cube ou hexaèdre, le tétraèdre et l'octaèdre. En effet par définition, du point de vue géométrique, tous les côtés et tous les angles des solides de Platon doivent être identiques. Le dodécaèdre, inscriptible dans une sphère, composé de 12 faces pentagonales et possédant 20 sommets répond à cette définition. Il est dual de l'icosaèdre qui lui possède 20 faces triangulaires et 12 sommets (*Figure 11*). Ces deux solides possèdent donc le même type d'axes de symétrie et peuvent être traités de manière identique par les

programmes d'analyse d'images chargés de recalculer leurs volumes tridimensionnels à partir de leurs projections.

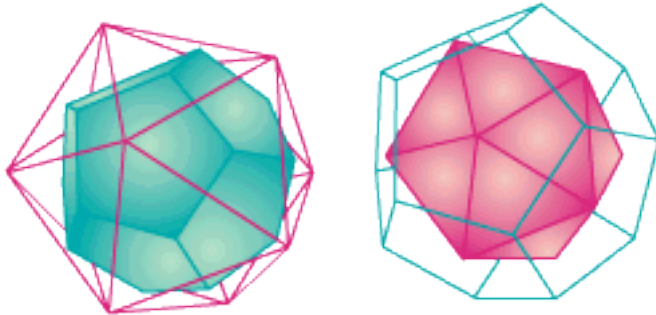


Figure 11 : Dualité des icosaèdres et des dodécaèdres. Un dodécaèdre peut être inscrit dans un icosaèdre (à gauche) et réciproquement (droite).

Historique

La première mise en évidence des dodécaèdres adénoviraux date de 1966, une époque où la structure des adénovirus et de leurs constituants était peu connue. En purifiant les antigènes solubles produits lors de l'infection de cellules humaines par l'Ad3, Norrby a observé des structures présentant une symétrie dodécaédrique ressemblant à une étoile à cinq ou six branches: les dodécaèdres. Ces dodécaèdres étaient formés, d'après l'auteur, par des protéines ayant une structure tubulaire et autour desquelles pouvaient être retrouvés cinq ou six « points » (Norrby, 1966). Ces structures tubulaires correspondent à ce que nous appelons aujourd'hui les bases du penton et les points correspondent aux domaines tête de la fibre. Dans ce travail, Norrby remarquait que les composants formant le dodécaèdre (les pentons) étaient normalement présents aux 12 sommets de la capsid virale. L'observation de ce matériel en microscopie électronique a permis à Norrby de définir une taille de 22,5 à 27,5 nm pour le coeur du dodécaèdre (les bases du penton) et de 40 à 50 nm entre deux "points" opposés (les domaines tête des fibres).

Sérotypes et dodécamérisation

Depuis cette première description, d'autres travaux ont permis de mettre en évidence la présence ou l'absence de dodécaèdres dans des cellules infectées par différents sérotypes d'adénovirus humains. Ainsi le sérotype 4 (Norrby and Wadell, 1967), le sérotype 7 (Neurath and Rubin, 1968), le sérotype 11 (Norrby, 1968) et les sérotypes 9 et 15 (Norrby et al., 1967)

sont connus pour donner des structures dodécaédriques lors de leur cycle d'infection alors que la présence de dodécaèdres n'a jamais pu être détectée pour les sérotypes 1, 2, 5 et 6 (Wadell and Norrby, 1969), le sérotype 12 (Norrby and Ankerst, 1969) et le sérotype 16 (Norrby and Skaaret, 1968) ou pour les adénovirus entériques (Ad40 et Ad41).

La formation de dodécaèdres ne semble pas être dépendante des sous-groupes d'adénovirus (*Tableau 1*) et n'a pas encore pu être corrélée avec la séquence primaire des différentes bases du penton. Il est intéressant de noter que si aucun sérotype du sous-groupe C ne produit naturellement de dodécaèdre, la structure de la base de l'Ad2 a été résolue à partir d'un cristal de bases du penton qui se sont dodécamérisées au cours de la cristallogénèse dans 1.5 M ammonium sulfate et 10% dioxane (Zubieta et al., 2005).

Sous-groupe	Sérotypes dont les pentons forment des dodécaèdres	Sérotypes dont les pentons ne forment pas des dodécaèdres	Aucune donnée n'existe pour les sérotypes indiqués
A		12	18, 31
B	3, 7, 11,	16,	14, 21, 34, 35
C		1, 2, 5, 6	
D	9, 15		8, 10, 13, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42
E	4		
F		40, 41	

Tableau 1 : Formation de dodécaèdres en fonction des sérotypes d'adénovirus. La formation de dodécaèdres a été observée pour les sérotypes indiqués en rouge alors que les sérotypes indiqués en bleu n'en forment pas. Aucune donnée n'existe pour les sérotypes indiqués en noir.

2 – Résultats

a - Le dodécaèdre

P. Fender, P. Fuschiotti, E. Hewat, R. Ruigrok J. Chroboczek et J. Conway (IBS)

J'avais déterminé, en thèse, la structure 3D des dodécaèdres avec et sans fibres à 25 et 20 Å de résolution par cryomicroscopie électronique (Schoehn et al., 1996). En collaboration avec les docteurs J. Conway, P. Fuschiotti, E. Hewat et P. Fender (IBS), j'ai

repris cette étude en analysant un plus grand nombre de particules avec des programmes différents. Une première reconstruction avait permis d'augmenter la résolution jusqu'à environ 12-15 Å en travaillant sur le microscope CM200 LaB6 de l'IBS puis jusqu'à 9 Å sur le microscope JEOL FEG. La reconstruction à 15 Å de résolution a servi de modèle de phasage pour la base du penton de l'adénovirus de sérotype 2 qui a été cristallisé sous forme de dodécaèdre (voir *figure 16*).

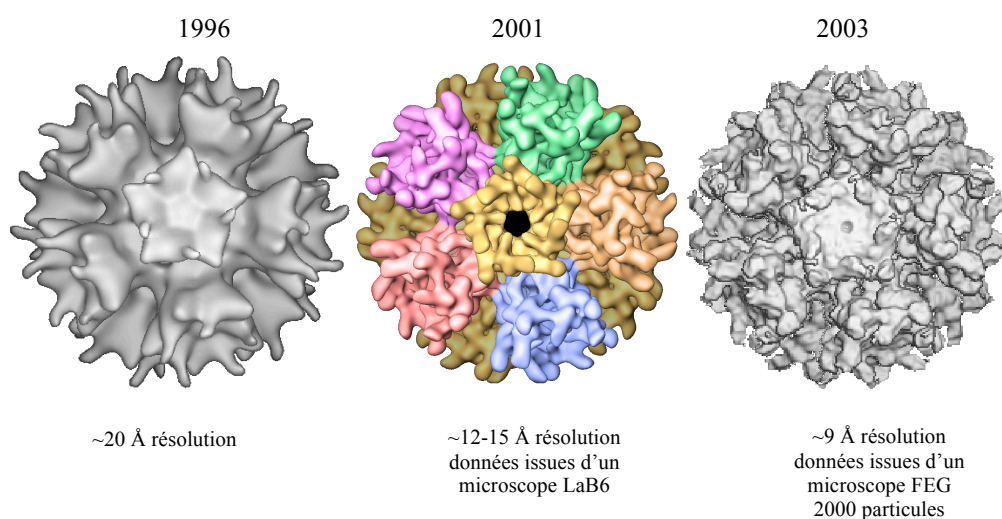


Figure 12 : Evolution de la qualité des reconstructions au fil des ans

La reconstruction à plus haute résolution a apporté de nombreuses informations sur les contacts existants entre les 12 bases dans le dodécaèdre de l'Ad3 ainsi qu'un modèle de comparaison avec les bases de l'Ad2. Des différences d'une dizaine d'acides aminés sont visibles au niveau de la boucle hyper variable. Par contre, la boucle portant la séquence RGD, dont la structure atomique n'a pas été déterminée dans le cas de l'Ad2 pour cause de flexibilité, n'est pas visible dans notre reconstruction bien que de longueur plus réduite. Seuls quelques acides aminés supplémentaires peuvent occuper la densité obtenue par microscopie électronique et analyse d'images. Nous avons en effet recalé les données cristallographiques de la base du penton de l'Ad2 dans l'enveloppe du dodécaèdre de l'Ad3 (Fuschiotti et al., 2006a) (*Figure 13*). Nous commençons également à comprendre les raisons des problèmes de stabilité que nous avons rencontré : il semble que pour des raisons d'encombrement stérique, le dodécaèdre ne se forme que lorsque les 35 premiers acides aminés de la base sont absents. Nos collaborateurs cherchent à confirmer cette hypothèse en re-clonant la base du penton de l'Ad3 à partir de l'acide aminé 35. Pour pouvoir utiliser le dodécaèdre comme transporteur de médicament ou de drogue, il faut être capable de contrôler l'assemblage-

désassemblage du dodécaèdre. Nous avons réussi en jouant sur les conditions de pH et sur la nature du tampon à incorporer des particules d'or dans ces dodécaèdres. Ceci représente la première étape pour l'utilisation thérapeutique des dodécaèdres (Fuschiotti et al ., 2006b).

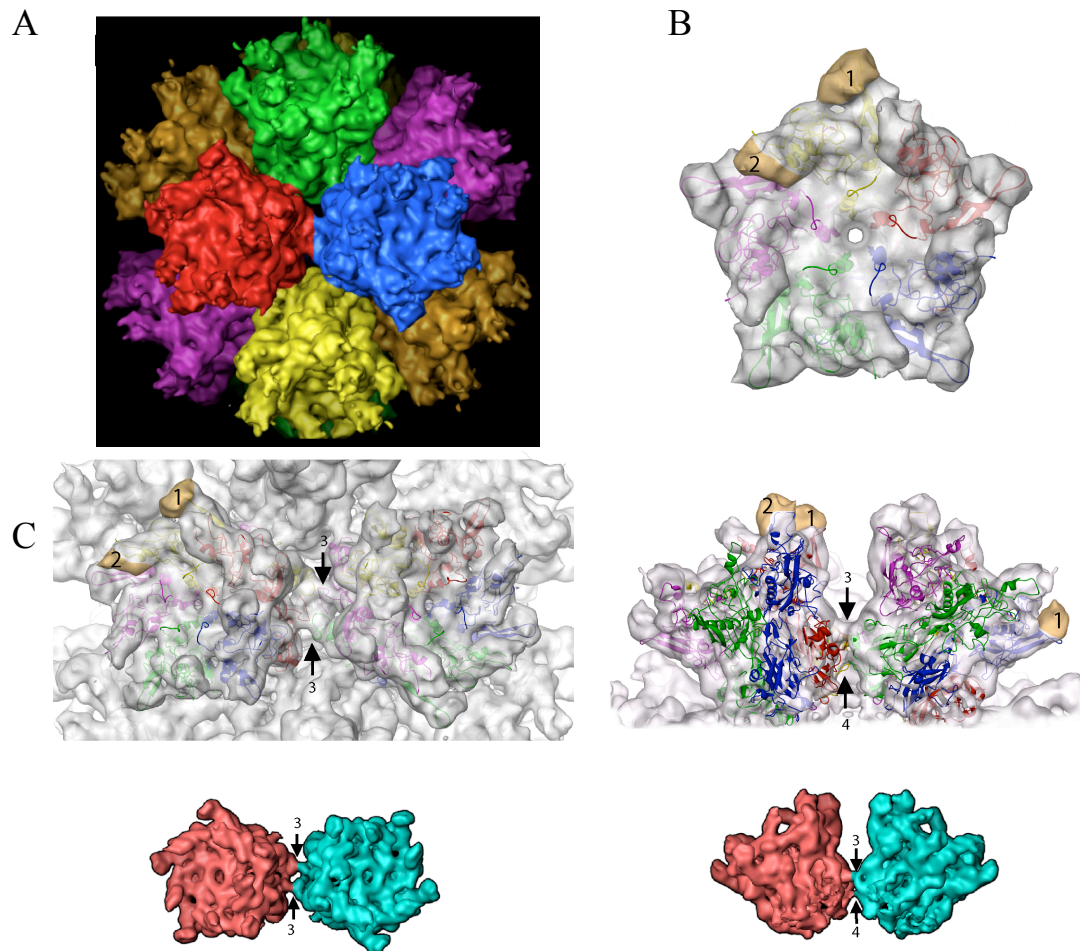


Figure 13 : le dodécaèdre sans fibre

A - Structure tridimensionnelle du dodécaèdre à 9 Å de résolution vu selon son axe 2.

B - Recalage de la structure atomique de la base de l'adénovirus 2 dans l'enveloppe de la base de l'adénovirus 3 en vue de face (les deux zones de densité supplémentaires par rapport à l'Ad2 sont représentés en beige).

C - Recalage des données atomiques dans deux bases du penton adjacentes mettant en évidence les interactions entre ces deux éléments (3-4) ainsi que les zones de densités supplémentaires visibles dans la carte du dodécaèdre de l'adénovirus 3 (beige). Ces densités additionnelles peuvent être corrélées avec des insertions dans la séquence de l'Ad3 par rapport à celle de l'Ad2.

Parallèlement à cette étude, nous avons également amélioré la résolution de notre reconstruction du dodécaèdre avec fibre jusqu'à environ 16 Å (CM200, LaB6) (Figure 14).

Nous avons ainsi pu visualiser des striations présentes le long de la fibre et que l'on retrouve dans la structure cristallographique filtrée de la fibre de l'adénovirus 2. Ces striations peuvent également être corrélées avec les répétitions présentes dans la séquence de la tige de la fibre (Fuschiotti et al., 2006a).

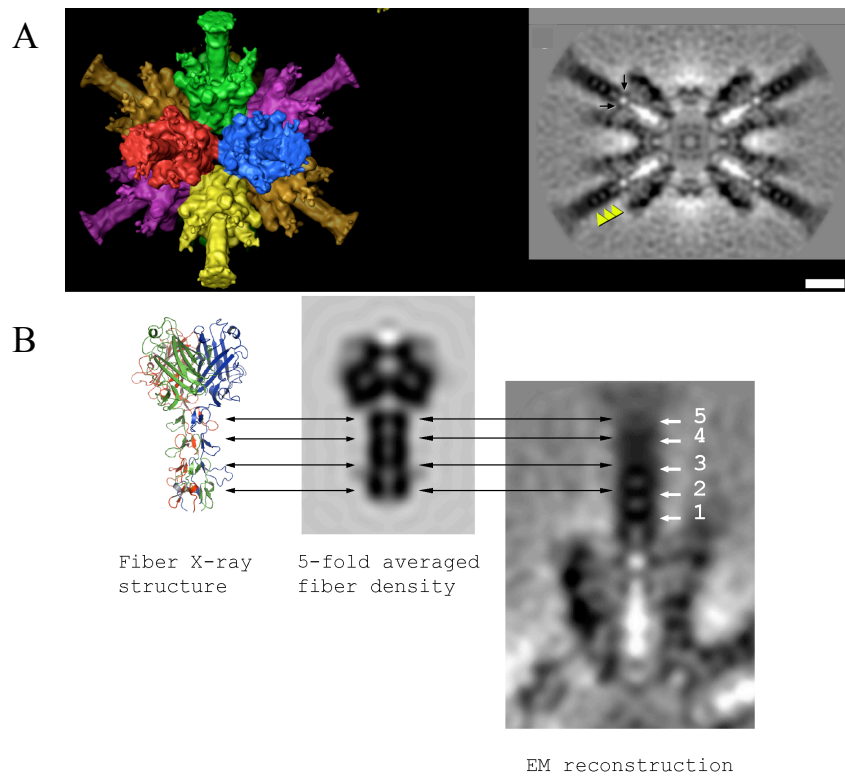


Figure 14 : Le dodécaèdre avec fibre

A - Structure 3D du dodécaèdre avec fibre de l'adénovirus 3 à 16 Å de résolution et densité de sa section centrale dans la même orientation. Cette dernière montre les striations présentes dans la fibre

B - Structure cristallographique de la tête de la fibre de l'adénovirus 2 avec une portion de la tige (van Raaij et al., 1999b). Cette structure a été filtrée à 16 Å de résolution, moyennée 5 fois pour mimer l'effet des reconstructions icosaédriques puis reprojétée. La reprojektion montre le même type de striations que la fibre dans le dodécaèdre (à droite).

Localisation structurale des sites d'interaction des héparanes sulfates sur les dodécaèdres

Les héparanes sulfates (HS) sont des chaînes de glycosaminoglycanes composées de la répétition d'un dissaccharide sulfaté. De nombreux virus utilisent ces chaînes d'HS pour s'attacher aux cellules (Vives, Lortat-Jacob, and Fender, 2006). Dans le cas de l'adénovirus entier, il a été montré que l'Ad2 et l'Ad5 utilisaient ces chaînes d'HS grâce à une interaction par les protéines « fibre ». L'Ad3 n'utilise pas ces groupements HS pour son endocytose (Dehecchi et al., 2000).

De façon étonnante, nos collaborateurs de l'IBS ont pu mettre en évidence que les dodécaèdres se comportaient tout à fait différemment des virus dont ils sont issus. En effet, aussi bien les dodécaèdres avec que ceux sans fibres pouvaient se fixer à 4°C sur des cellules CHO exprimant des HS alors qu'ils ne se fixaient pas sur un clone de ces cellules n'exprimant pas d'HS à leur surface (Vives et al., 2004). Des caractérisations biochimiques par résonance plasmonique de surface ont permis de confirmer que l'interaction se faisait par la base du penton avec une affinité pour les HS de l'ordre du nanomolaire. La fibre ne joue aucun rôle positif ou négatif dans cette interaction puisque les affinités trouvées étaient identiques pour les dodécaèdres avec et sans fibres. Des expériences de compétition avec de l'héparine soluble sur des cellules HeLa ont permis de déterminer que l'internalisation des dodécaèdres sans fibre était strictement dépendante d'une interaction avec les HS cellulaires. Ce résultat indique que l'internalisation des dodécaèdres sans fibre n'est pas due à une interaction directe de la base avec les intégrines mais à un processus séquentiel commençant par la reconnaissance des HS.

Nous avons cherché à localiser les sites de fixation des HS sur la base de l'Ad3 par microscopie électronique. Après cryomicroscopie électronique, nous avons pu calculer une reconstruction tridimensionnelle du dodécaèdre sans fibre en complexe avec un oligosaccharide d'HS composé de 8 saccharides (dp8). La reconstruction 3D du complexe montre des densités supplémentaires par rapport aux dodécaèdres sans fibre seuls. Cette densité supplémentaire est localisée au niveau de la boucle RGD (*Figure 15*). L'analyse de la séquence primaire de la base Ad3 nous avait fait penser que cette région pouvait être impliquée dans la formation de ce complexe du fait de la présence de nombreux résidus basiques à proximité de la séquence RGD. La densité supplémentaire observée est trop importante pour être uniquement due à dp8 mais pourrait provenir de la somme des régions précédemment flexibles (voir *Figures 14 et 15*) et de dp8. Nous avons donc émis l'hypothèse que la fixation de dp8 entraînait un repliement de la boucle RGD qui par conséquent était dans une conformation plus favorable pour reconnaître les intégrines. Des études par

résonance plasmonique de surface sont actuellement en cours pour confirmer cette hypothèse.

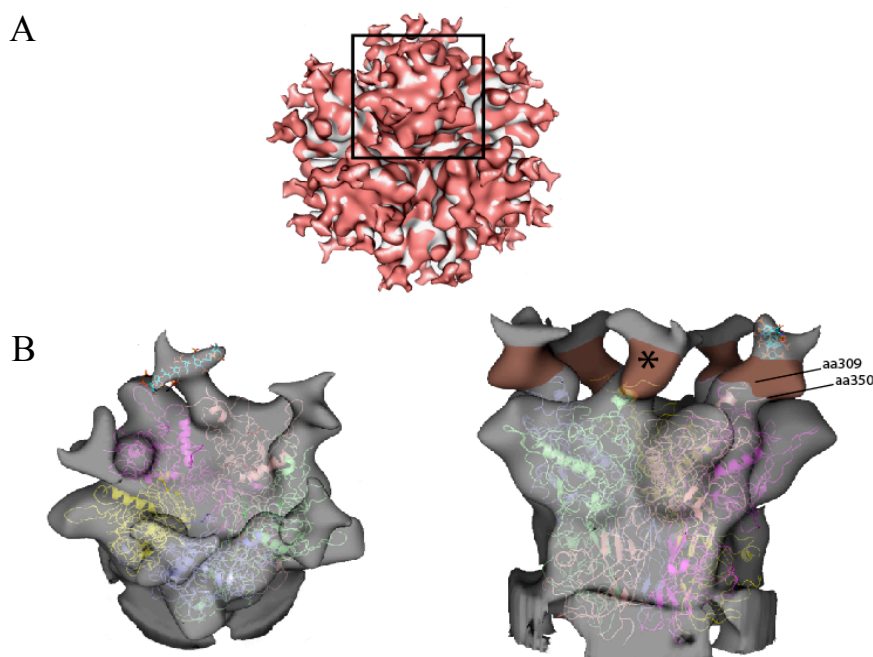


Figure 15 : Complexe dodécaèdre sans fibre - dp8

A - Superposition des reconstructions 3D du complexe entre le dodécaèdre sans fibre et un oligosaccharide d'héparane sulfate de 8 unités (dp8) (rose) et du dodécaèdre sans fibre natif (gris) à environ 20 Å de résolution.

B - Recalage de la structure cristallographique de la base Ad2 dans une base Ad3 complexée avec dp8. La densité colorée en marron () est attribuée à la boucle RGD précédemment trop flexible alors que la partie distale de ces protubérances montre une taille suffisante pour contenir la structure cristallographique d'un oligosaccharide d'héparane sulfate de 8 unités.*

Projet sur les dodécaèdres avec fibres

J'ai pour projet de retravailler sur le dodécaèdre avec fibres pour déterminer de manière précise comment cette fibre interagit avec la base. Si les images de ces dodécaèdres avec fibres sont de très bonne qualité, il devrait être possible de visualiser, après analyse d'images, l'attachement de la fibre sur la base du penton. La fibre est en effet un trimère qui peut s'associer de deux manières différentes avec les cinq sites disponibles sur la base pentamérique : soit les trois queues N-terminales placées de manière adjacentes les unes aux autres soit deux queues adjacentes et la troisième dans une position opposée. Il serait très intéressant d'obtenir une vue des deux jonctions possibles de la fibre avec la base. Des

techniques de classification existent déjà pour détecter ce genre de différences. J'aimerais également résoudre la structure des complexes entre les dodécaèdres les héparanes sulfate et les intégrines. Des expériences sur ces complexes sont actuellement en cours.

b - Structure cristalline des pentons de l'adénovirus

C. Zubieta et S. Cusack (EMBL)

L'enveloppe du dodécaèdre de l'adénovirus 3 obtenue à une résolution de 15 Å par microscopie électronique a servi à phaser les données de cristallographie obtenues sur la base du penton de l'Ad2. Ce modèle initial a permis de résoudre la structure cristallographique de la base du penton de l'Ad2 à 3.5 Å de résolution (*Figure 16*). (Zubieta et al., 2005)

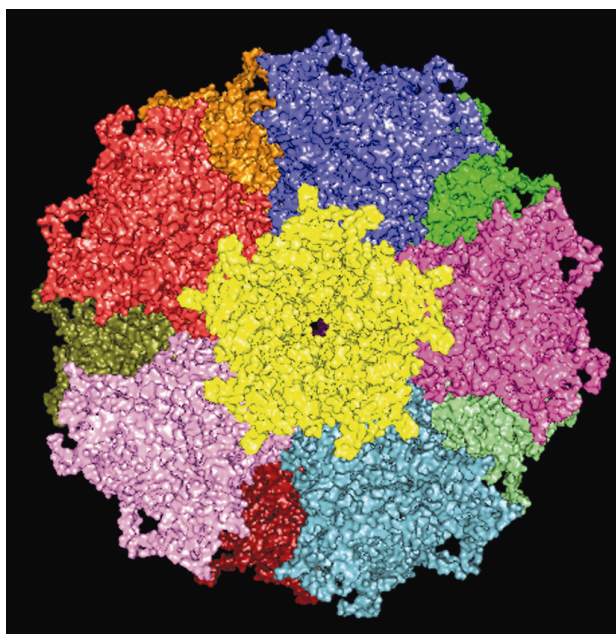


Figure 16 : structure cristallographique du dodécaèdre de l'adénovirus 2.

c- L'adénovirus entier

C. Fabry, M El Bakkouri (Etudiantes en 3^{ème} année de thèse)

Les structures cristallographiques des hexons de l'Ad5 et de la base du penton de l'Ad2 sont maintenant connues. Ces deux sérotypes sont extrêmement proches l'un de l'autre. Par microscopie électronique, nous avons obtenu une structure 3D de l'adénovirus 5 complet à haute résolution (10-12 Å) puis repositionné les différentes structures cristallographiques connues dans cette enveloppe à l'aide des programmes URO et SITUS de

recalage de données (*Figure 17*) (URO, Navazza et al., 2002 ; SITUS, Wriggers et al., 2001). Nous avons ainsi non seulement visualisé les contacts qui existent entre les hexons et les bases des pentons mais également localisé très précisément les protéines mineures de la capsid (Fabry et al., 2005). Certaines boucles de l'hexon, non ordonnées dans la structure cristalline, sont visibles dans l'enveloppe de microscopie électronique (*Figure 17 droite*).

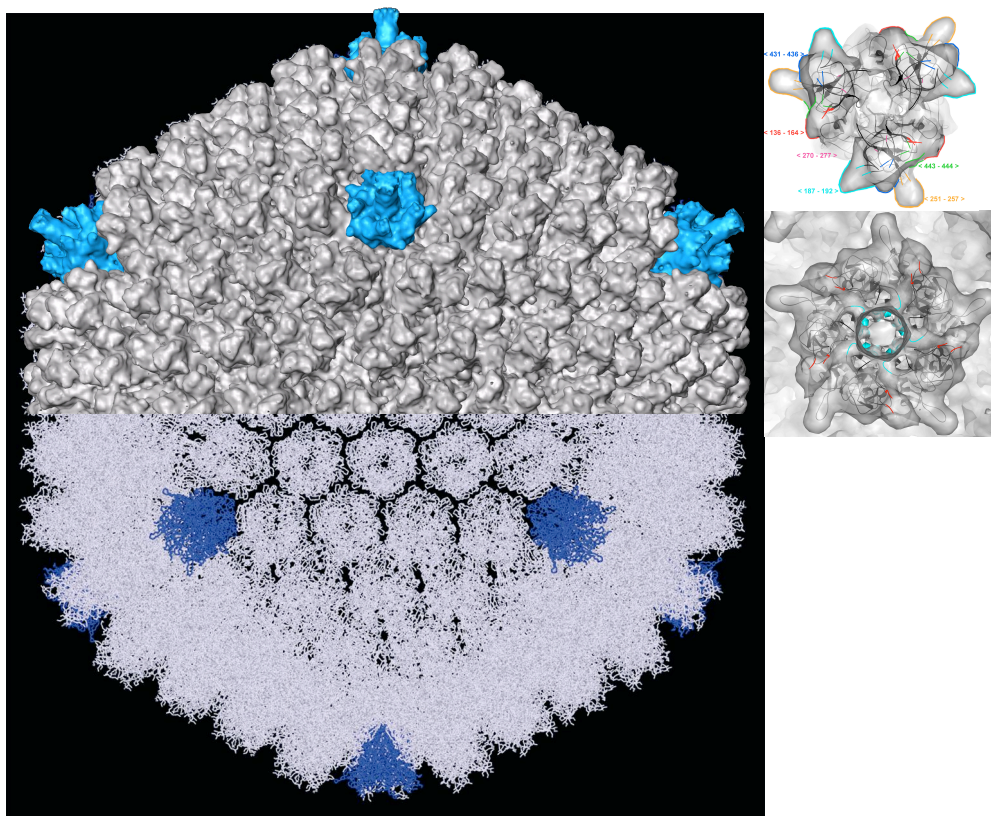


Figure 17 : Recalage des données de cristallographie dans l'enveloppe de microscopie de l'adénovirus à 10Å de résolution. Sur la gauche représentation mixte de l'adénovirus entier (structure 3D de microscopie et modèle quasi-atomique). Sur la droite, détail des recalages de la base du penton et de l'hexon.

Nous avons également déterminé la structure tridimensionnelle d'un adénovirus n'ayant pas de protéine IX (une des protéines mineures externes). Cette protéine localisée sur les faces de l'adénovirus et formant des trimères était bien absente de notre reconstruction. Par contre, une densité cylindrique située à l'extérieur de la capsid et que l'on attribuait à la protéine mineure IIIa était également absente (*Figure 18*, densité rouge). Nous avons émis l'hypothèse que l'absence de protéine IX déstabilisait la capsid et entraînait la perte de la protéine IIIa. Depuis cette étude plusieurs publications sur le même sujet (Saban et al., 2006 ;

Marsh et al., 2006) suggèrent que la densité cylindrique attribuée à la protéine IIIa puisse être la partie C-terminale de la protéine IX.

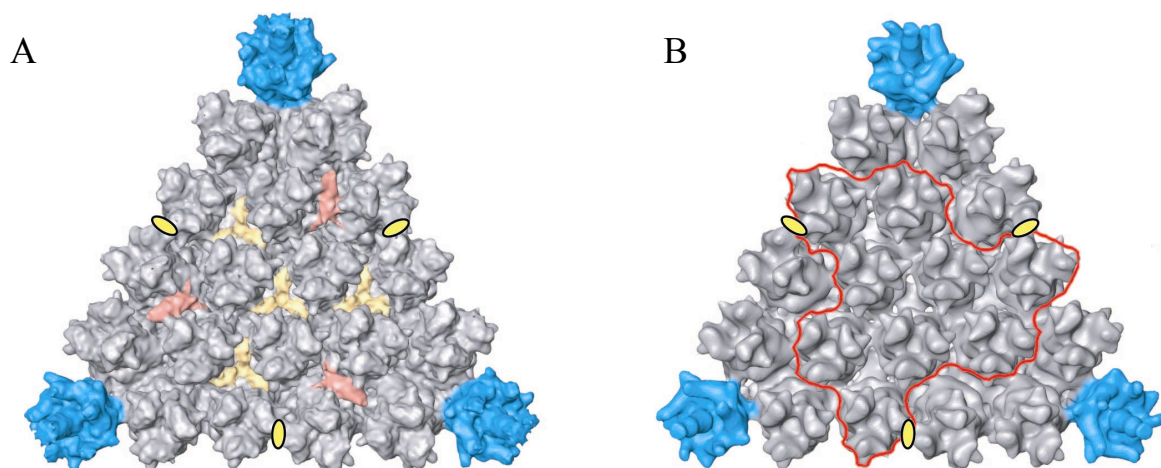


Figure 18 : Comparaison Ad5 – Ad5 delta pIX

A - Facette de l'Ad5 sauvage (10 Å de résolution). Le penton est représenté en bleu, la protéine IX en jaune et la densité rouge était supposée être la protéine IIIa

B - Facette de l'Ad5 delta pIX (16 Å de résolution). Les densités jaune et rouge sont absentes dans le virus mutant delta pIX.

Nous essayons de résoudre cette ambiguïté par différentes approches :

- détermination de la structure d'un complexe adénovirus – Fab anti C-ter pIX
- détermination de la structure d'adénovirus exotique (canin, porcine) dont les protéines IX sont de tailles différentes.
- détermination de la structure de l'adénovirus canin avec une GFP greffée sur la partie C-terminale de la protéine IX (Figure 19)

L'adénovirus canin de sérotype 2 a une composition structurale très similaire à celle des adénovirus humains comme le montre la structure que nous avons déterminé (Schoehn et al.,

2008). Les protéines canines sont en général légèrement plus petites en nombre d'acides aminés que leurs équivalents humains. En particulier, la protéine IX canine ne possède pas la partie centrale riche en alanine chez la protéine humaine (figure 19). Nous pensions pouvoir localiser cette différence dans le virus entier et comme nous avions également à notre disposition un virus canin dans lequel la partie C-terminale de la protéine XI était fusionnée avec la protéine GFP nous espérions localiser la partie C-terminale de la protéine IX dans la capsid. La résolution de la structure de ces deux virus (natif et protéine IX-GFP) a non seulement confirmé l'hypothèse quant à la localisation de la partie C-terminale de la protéine IX mais a également montré que cette partie C-terminale pouvait occuper une position différente suivant les virus (soit au dessus du triskélium de la partie N-terminale dans le cas du virus canin soit à l'interface entre deux facettes à l'emplacement connu comme étant celui de la protéine IIIa (virus humain) (figure 19), (Schoehn et al., 2008).

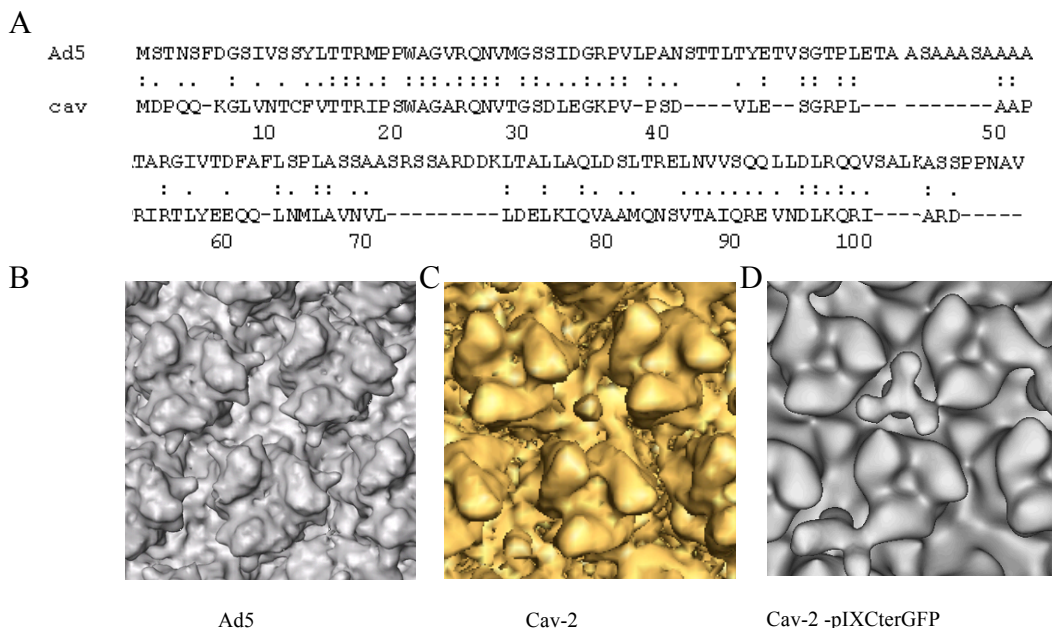


Figure 19 : Comparaison des protéines IX de l'adénovirus humain de sérotype 5 et de l'adénovirus canin de sérotype 2

A - Comparaison des séquences des protéines IX de Ad5 et Cav2. La protéine de Cav2 est plus courte que celle de Ad5

B - Centre d'une facette de l'Ad5 montrant la densité attribuée à la protéine IX (entre les 3 hexons)

C - Centre d'une facette de Cav2 montrant la densité attribuée à la protéine IX avec une densité cylindrique localisée au centre de la protéine IX (la densité attribuée à la protéine IX est plus grande malgré une taille de protéine plus petite).

D - Centre d'une facette de Cav2-pIXCterGFP montrant la densité attribuée à la protéine IX

fusionnée avec la protéine GFP.

La localisation de la partie C-terminale de la protéine IX a également été confirmée en travaillant sur un virus dans lequel la partie C-terminale de la protéine IX a été fusionnée avec un peptide SY12 (Boulangier et Rosa-Calatrava communication personnelle). Nous avons à notre disposition un anticorps qui reconnaît ce peptide. Nous avons donc pu complexer les Fabs correspondants avec le virus et en recalculer la structure 3D (figure 20a). En comparant le virus seul (figure 20b) et le complexe (figure 20a) nous avons observé une disparition de la partie C-terminale de la protéine IX (rouge sur la figure 20b) et l'apparition d'une structure ressemblant très fortement à deux Fabs juste au dessus de ces cylindres. La fixation des Fabs a probablement déstabilisé les parties C-terminales des protéines IX (chaque densité cylindrique rouge serait l'association de 4 domaines C-terminaux).

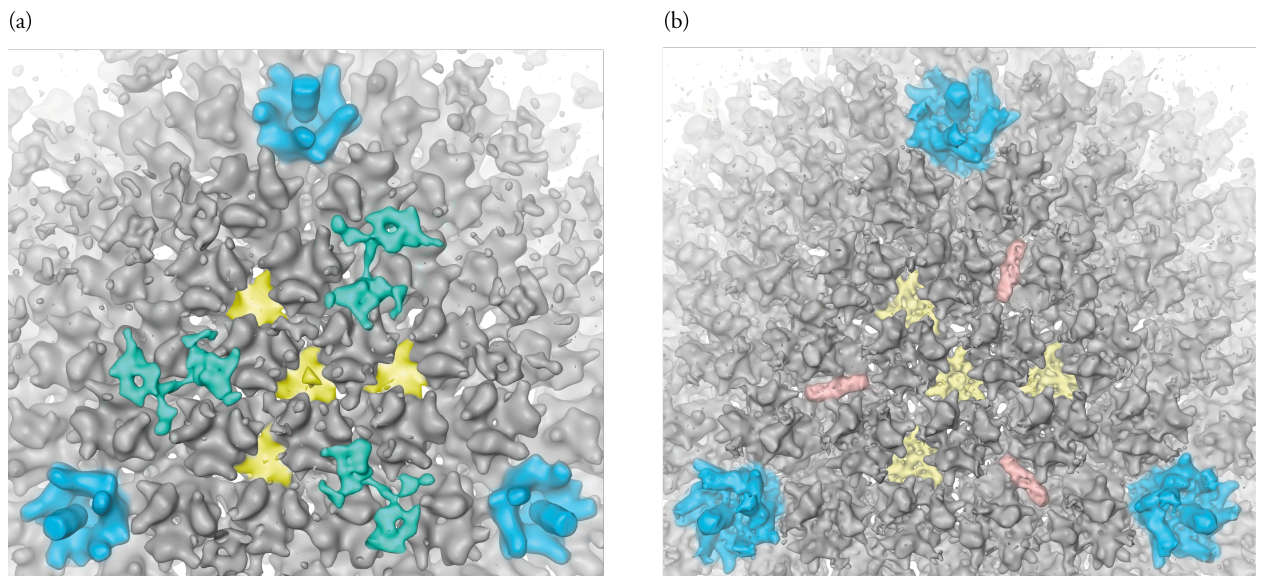


Figure 20 : Adénovirus humains dont les parties C-terminales des protéines IX sont fusionnés avec un peptide SY12. A gauche (a) le virus neutralisé par des Fabs anti-SY12. Les pentons sont représentés en bleu foncé, les hexons sont en gris. Les parties N-terminales des protéines IX sont en jaune et les Fabs (qui sont situés à la surface du virus) sont colorés en bleu clair. A droite (b) le virus modifié SY12 seul. Les pentons sont représentés en bleu foncé, les hexons sont en gris. Les parties N-terminales des protéines IX sont en jaune et les parties C-terminales sont en rouges.

3 - Projet : Compréhension de la structure des adénovirus

Dans un premier temps nous voulons essayer d'atteindre les limites du microscope FEG de l'IBS (environ 6 Å pour une virus de la taille de l'adénovirus (Hewat et Neumann 2002)).

Notre dernière reconstruction est actuellement aux environs de 8 Å de résolution. La limite des 6 Å implique le traitement et la gestion de quantités importantes de données. Nous voulons utiliser l'enveloppe haute résolution recalculée à partir de la microscopie électronique pour recalibrer les données cristallographiques des différents composants de cette structure (connus actuellement et en cours de détermination) et obtenir une structure de la capsidite à résolution quasi atomique. Si nous atteignons une résolution de 6 Å, les méthodes classiques de recalage des données ne seront plus suffisantes. Nous envisageons d'utiliser la technique des modes normaux pour décrire et déformer les structures atomiques des protéines et les adapter à leur environnement icosaédrique. Ce type d'analyse des modes normaux (expression de la dynamique d'une protéine en terme de variables collectives) est actuellement en développement pour permettre d'optimiser la structure atomique d'une protéine par rapport à l'enveloppe de cette même protéine obtenue par microscopie électronique (déplacement d'une hélice α ou d'une partie de la protéine par rapport à son cœur).

En parallèle avec la microscopie électronique nous essayons de déterminer la structure atomique des protéines mineures de l'adénovirus. Ces protéines cimentent la capsidite mais aucune de leur structure n'est pour l'instant connue. Nous essayons actuellement de cristalliser deux des protéines mineures de l'adénovirus (IIIa et IX)

L'obtention d'une structure à haute résolution (6 Å) de l'adénovirus entier par cryomicroscopie électronique nous permettra de voir la structure fine (hélice α et feuillettes) des protéines dans leur contexte naturel (au sein du virus) avec des adaptations dues aux environnements différents (quasi-équivalence ou différence en fonction de la position des hexones dans la capsidite). D'un autre côté, la structure atomique des protéines mineures nous apportera une information très détaillée mais figée de ces protéines. La combinaison de ces données nous permettra de compléter et d'affiner notre modèle de capsidite à résolution quasi-atomique. Nous aurons ainsi accès à une vue très détaillée (quasi atomique) de la structure d'un gros virus à ADN.

Mon activité de recherche se tourne également vers la dynamique des adénovirus. J'ai en effet pour projet de déterminer la structure d'un mutant thermosensible de l'adénovirus. Ce mutant possède une protéase inactive. Le virus ainsi produit n'est donc pas mature. L'étude de ce virus nous permettra de mieux comprendre les étapes de maturation de ces virus. A l'autre extrémité du cycle de vie du virus, je commence également à étudier le transport de l'adénovirus vers le noyau après pénétration dans la cellule. Ce transport a lieu

via les microtubules et met en jeu la chaîne légère de la kinésine humaine de type 2 (plus précisément la région présentant les répétition des tétratricopeptides , TRP). Mon projet est de déterminer la structure du complexe entre TRP et l'adénovirus par microscopie électronique. J'ai pour cela déjà à ma disposition le clone TRP.

Acquis des dernières années de recherche

- Encadrement de deux étudiantes en DEA (2003 Aurélie Albertini 50 % ; 2004 Céline Fabry 100% ; Ambroisse Desfosses 50% 2007)
- Encadrement de deux étudiantes en première année de thèse (Céline Fabry et Majida El Bakkouri ; directeur des travaux)
- Publication avec deux étudiantes (**Fabry et al., 2005, Albertini et al., 2005, 2006, 2007, Schoehn et al., 2004, Fuschiotti et al., 2006a ; Schoehn et al., 2006; Schoehn et al., 2008**)
- Obtention d'une bourse de thèse de la région
- Résolution nanométrique pour les reconstructions tridimensionnelles obtenues
- Combinaison des données cristallographiques – microscopie
- Responsable de deux microscopes électronique (EMBL, IBS)

RÉFÉRENCES

- Albertini AA, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW. (2008) Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci*. In press
- Albertini AA, Clapier CR, Wernimont AK, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW. (2007) Isolation and crystallization of a unique size category of recombinant Rabies virus Nucleoprotein-RNA rings. *J Struct Biol*. 158(1):129-33.
- Albertini AA, Wernimont AK, Muziol T, Ravelli RB, Clapier CR, Schoehn G, Weissenhorn W, Ruigrok RW (2006) Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*. **313(5785)**:360-3.
- Athappilly FK, Murali R, Rux JJ, Cai Z, Burnett RM (1994) The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol*. 242(4):430-55.
- Barge, A., Gaudin, Y., Coulon, P., and Ruigrok, R.W. (1993). Vesicular stomatitis virus M protein may be inside the ribonucleocapsid coil. *J. Virol*. **67**, 7246-7253.
- Belin, M. T., and Boulanger, P. (1993). Involvement of cellular adhesion sequences in the attachment of adenovirus to the HeLa cell surface. *J Gen Virol* **74 (Pt 8)**, 1485-97
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L., and Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275(5304)**, 1320-3.
- Bewley, M. C., Springer, K., Zhang, Y. B., Freimuth, P. & Flanagan, J. M. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* **286**, 1579-1583.
- Burmeister, W.P., Guilligay, D., Cusack, S., Wadell, G. & Arnberg, N. (2004). Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *J. Virol*. **78**, 7727-7736.
- Davison, A. J., Benko, M., and Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* **84(Pt 11)**, 2895-908.
- Dechecchi, M. C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M., and Cabrini, G. (2001). Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *J Virol* **75(18)**, 8772-80.

- Dechechi, M. C., Tamanini, A., Bonizzato, A., and Cabrini, G. (2000). Heparan sulfate glycosaminoglycans are involved in adenovirus type 5 and 2-host cell interactions. *Virology* **268**(2), 382-90.
- Dessen A., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D., Weissenhorn W. (2000). Crystal structure of the matrix protein VP40 from ebola virus. *EMBO J.* **19**, 4228-4236.
- Durmort, C., Stehlin, C., Schoehn, G., Mitraki, A., Drouet, E., Cusack, S. & Burmeister, W.P. (2001). Structure of the fiber head of Ad3, a non-CAR-binding serotype of adenovirus. *Virology* **285**, 302-312.
- Egelman EH. A robust algorithm for the reconstruction of helical filaments using single-particle methods. *Ultramicroscopy*. (2000) **85** 225-34.
- Fabry CM, Rosa-Calatrava M, Conway JF, Zubieta C, Cusack S, Ruigrok RW, **Schoehn G**. A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J.* **24**, 1645-54.
- Fender, P., Ruigrok, R. W., Gout, E., Buffet, S., and Chroboczek, J. (1997). Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat Biotechnol* **15**(1), 52-6.
- Fuschiotti, P., Schoehn, G., Fender, P., Fabry, C. M., Hewat, E. A., Chroboczek, J., Ruigrok, R. W., and Conway, J. F. (2006a). Structure of the dodecahedral penton particle from human adenovirus type 3. *J Mol Biol* **356**(2), 510-20.
- Fuschiotti P, Fender P, **Schoehn G**, Conway JF. (2006b). Development of the dodecahedral penton particle from adenovirus 3 for therapeutic application. *J Gen Virol.* **87**:2901-5.
- Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., and Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med* **9**(11), 1408-12.
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P., and Helenius, A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**(3), 477-86.
- Green, N. M., Wrigley, N. G., Russell, W. C., Martin, S. R., and McLachlan, A. D. (1983). Evidence for a repeating cross-beta sheet structure in the adenovirus fibre. *Embo J* **2**(8), 1357-65.
- Hong, S. S., Karayan, L., Tournier, J., Curiel, D. T., and Boulanger, P. A. (1997). Adenovirus type 5 fiber knob binds to MHC class I alpha2 domain at the surface of human epithelial and B lymphoblastoid cells. *Embo J* **16**(9), 2294-306.
- Hewat EA, Neumann E. (2002) Characterization of the performance of a 200-kV field emission gun for cryo-electron microscopy of biological molecules. *J Struct Biol.* **139**(1):60-4.
- Iseni, F., Barge, A., Baudin, F., Blondel, D. and Ruigrok, R.W. (1998) Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol*, **79** (Pt 12), 2909-2919.

- Marsh M.P., Campos S.K., Baker M.L., Chen C.Y., Chiu W., Barry M.A. (2006) Cryoelectron microscopy of protein IX-modified adenoviruses suggests a new position for the C terminus of protein IX. *J Virol.* ;**80**(23):11881-6.
- Marttila, M., Persson, D., Gustafsson, D., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., Wadell, G., and Arnberg, N. (2005). CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* **79**(22), 14429-36.
- Mathias, P., Galleno, M., and Nemerow, G. R. (1998). Interactions of soluble recombinant integrin alpha v beta 5 with human adenoviruses. *J Virol* **72**(11), 8669-75.
- Miyazawa, N., Crystal, R. G., and Leopold, P. L. (2001). Adenovirus serotype 7 retention in a late endosomal compartment prior to cytosol escape is modulated by fiber protein. *J Virol* **75**(3), 1387-400.
- Miyazawa, N., Leopold, P. L., Hackett, N. R., Ferris, B., Worgall, S., Falck-Pedersen, E., and Crystal, R. G. (1999). Fiber swap between adenovirus subgroups B and C alters intracellular trafficking of adenovirus gene transfer vectors. *J Virol* **73**(7), 6056-65.
- Navaza, J., Lepault, J., Rey, F.A., Alvarez-Rua, C. and Borge, J. (2002) On the fitting of model electron densities into EM reconstructions: a reciprocal-space formulation. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1820-1825.
- Neurath, A. R., and Rubin, B. A. (1968). Interaction of p-chloromercuribenzoate with adenoviruses. Inactivation of haemagglutinins and degradation of virions of types 3, 4 and 7. *J Gen Virol* **2**(2), 215-29.
- Nguyen TL, Schoehn G, Weissenhorn W, Hermone AR, Burnett JC Panchal RG, McGrath C, Zaharevitz DW, Aman MJ, Gussio R, Bavari S (2005) An all-atom model of the pore-like structure of hexameric VP40 from Ebola: Structural insights into the monomer–hexamer transition. *J Struct. Biol.* **151**(1) : 30-40.
- Norrby, E. (1966). The relationship between the soluble antigens and the virion of adenovirus type 3. II. Identification and characterization of an incomplete hemagglutinin. *Virology* **30**(4), 608-17.
- Norrby, E. (1968). Identification of soluble components of adenovirus type 11. *J Gen Virol* **2**(1), 123-33.
- Norrby, E., and Ankerst, J. (1969). Biological characterization of structural components of Adenovirus type 12. *J Gen Virol* **5**(2), 183-94.
- Norrby, E., Nyberg, B., Skaaret, P., and Lengyel, A. (1967). Separation and characterization of soluble adenovirus type 9 components. *J Virol* **1**(6), 1101-8.
- Norrby, E., and Skaaret, P. (1968). Comparison between soluble components of adenovirus types 3 and 16 and of the intermediate strain 3-16 (the San Carlos agent). *Virology* **36**(2), 201-11.

- Norrby, E., and Wadell, G. (1967). Soluble components of adenovirus type 4. *Virology* **31**(4), 592-600.
- Persson BD, Reiter DM, Marttila M, Mei YF, Casasnovas JM, Arnberg N, Stehle T. (2007) Adenovirus type 11 binding alters the conformation of its receptor CD46. *Nat Struct Mol Biol.* **14**(2):164-6.
- Roberts MM, White JL, Grutter MG, Burnett RM (1986) Three-dimensional structure of the adenovirus major coat protein hexon. *Science.* **232**(4754):1148-51.
- Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I., and Wickham, T. J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* **72**(10), 7909-15.
- Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., and Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* **84**(3), 570-3.
- Ruigrok, R. W., Barge, A., Albiges-Rizo, C., and Dayan, S. (1990). Structure of adenovirus fibre. II. Morphology of single fibres. *J Mol Biol* **215**(4), 589-96.
- Ruigrok R.W., Schoehn G., Dessen A., Forest E., Volchkov V., Dolnik O., Klenk H.D. and Weissenhorn W. (2000). Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J. Mol. Biol.*, **300**, 103-112.
- Rux, J.J. and Burnett, R.M. (2000) Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon. *Mol Ther*, **1**, 18-30.
- Saban SD, Silvestry M, Nemerow GR, Stewart PL (2006) Visualization of alpha-helices in a 6-angstrom resolution cryoelectron microscopy structure of adenovirus allows refinement of capsid protein assignments. *J Virol.* **80**(24):12049-59.
- Schoehn G, El Bakkouri M, Fabry CCM, Billet O, Estrozi LF, Le L, Curiel DT, Andrey V, Kajava AV, Ruigrok RWH & Kremer EJ. (2008). 3D structure of canine adenovirus serotype 2 capsid. *J Virol* in press.
- Schoehn G, Vellieux FMD, Dura MA, Receveur-Brechot V, Fabry CMS, Ruigrok RWH, Ebel C, Roussel A, Franzetti B, (2006). An archeal peptidase assembles into two different quaternary structures: a tetrahedron and a giant octahedron. *J Biol Chem.* **281**(47):36327-37
- Schoehn G, Mavrakis M, Albertini A, Wade R, Hoenger A, Ruigrok RW. (2004) The 12 Å structure of trypsin-treated measles virus N-RNA. *J Mol Biol.* ; **339**(2) : 301-12.
- Schoehn G., Iseni F., Mavrakis M., Blondel D. and Ruigrok R.W.H. (2001). Structure of recombinant rabies virus N-RNA and identification of the phosphoprotein binding site. *J. Virol.* **75**, 490-498.

- Schoehn G., Hayes M., Cliff M., Clarke A.R. and Saibil H.R. (2000b). Domains rotations between open, closed and bullet shaped forms of the thermosome, an archaeal chaperonin. *J. Mol. Biol.*, **301**, 323-332.
- Schoehn G., Quate-Randall E., Jimenez J.L., Joachimiak A. and Saibil H.R. (2000a). Three conformations of an archeal chaperonin, TF55 from *Sulfolobus shibatae*. *J Mol. Biol.*, **296**, 813-819.
- Schoehn, G., Moss, S.R., Nuttall, P.A. and Hewat, E.A. (1997). Structure of Broadhaven virus by cryo-electron microscopy : correlation of structural and antigenic properties of Broadhaven virus and Bluetongue virus outer capsid proteins. *Virology*, **235**, 191-200.
- Schoehn, G., Fender, P., Chroboczek, J. and Hewat, E.A. (1996). Adenovirus 3 penton dodecahedron exhibits structural changes of the base on fibre binding. *EMBO J.*, **15**, 6841-6846.
- Scianimanico S., Schoehn G., Timmins J., Ruigrok R.H.W., Klenk, H.D. and Weissenhorn W. (2000). Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *EMBO J.* **19**, 6732-6741.
- Segerman, A., Arnberg, N., Erikson, A., Lindman, K., and Wadell, G. (2003a). There are two different species B adenovirus receptors: sBAR, common to species B1 and B2 adenoviruses, and sB2AR, exclusively used by species B2 adenoviruses. *J Virol* **77**(2), 1157-62.
- Segerman, A., Atkinson, J. P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G., and Arnberg, N. (2003b). Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* **77**(17), 9183-91.
- Seiradake, E. & Cusack, S. (2005). Crystal structure of enteric adenovirus serotype 41 short fiber head. *J. Virol.*, **79**, 14088-14094.
- Short, J. J., Pereboev, A. V., Kawakami, Y., Vasu, C., Holterman, M. J., and Curiel, D. T. (2004). Adenovirus serotype 3 utilizes CD80 (B7.1) and CD86 (B7.2) as cellular attachment receptors. *Virology* **322**(2), 349-59.
- Sirena, D., Lilienfeld, B., Eisenhut, M., Kalin, S., Boucke, K., Beerli, R. R., Vogt, L., Ruedl, C., Bachmann, M. F., Greber, U. F., and Hemmi, S. (2004). The human membrane cofactor CD46 is a receptor for species B adenovirus serotype 3. *J Virol* **78**(9), 4454-62.
- Stewart, P.L., Burnett, R.M., Cyrklaff, M. and Fuller, S.D. (1991) Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell*, **67**, 145-154.
- Stewart, P.L., Fuller, S.D. and Burnett, R.M. (1993) Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *Embo J.*, **12**, 2589-2599.
- Timmins J., Scianimanico S., Schoehn G. and Weissenhorn W. (2001). Vesicular Release of Ebola Virus Matrix Protein VP40. *Virology*. **283**, 1-6.

- Timmins J., Schoehn G., Kohlhaas C., Klenk HD, Ruigrok RWH, and Weissenhorn W. (2003a) Oligomerization and polymerization of the filovirus matrix protein VP40. *Virology* ; **312** : 359-68.
- Timmins J, Schoehn G, Ricard-Blum S, Scianimanico S, Vernet T, Ruigrok RW, Weissenhorn W. (2003b) Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol.* ; **326** : 493-502.
- van Raaij, M. J., Louis, N., Chroboczek, J. & Cusack, S. (1999a). Structure of the human adenovirus serotype 2 fiber head domain at 1.5 Å resolution. *Virology* **262**, 333-343.
- van Raaij, M.J., Mitraki, A., Lavigne, G. and Cusack, S. (1999b) A triple beta-spiral in the adenovirus fibre shaft reveals a new structural motif for a fibrous protein. *Nature*, **401**, 935-938.
- Vives, R. R., Lortat-Jacob, H., Chroboczek, J., and Fender, P. (2004). Heparan sulfate proteoglycan mediates the selective attachment and internalization of serotype 3 human adenovirus dodecahedron. *Virology* **321**(2), 332-40.
- Vives, R. R., Lortat-Jacob, H., and Fender, P. (2006). Heparan sulphate proteoglycans and viral vectors: ally or foe? *Curr Gene Ther* **6**(1), 35-44.
- Wadell, G., and Norrby, E. (1969). The soluble hemagglutinins of adenoviruses belonging to Rosen's subgroup 3. II. The slowly sedimenting hemagglutinin. *Arch Gesamte Virusforsch* **26**(1), 53-62.
- Walters, R. W., Freimuth, P., Moninger, T. O., Ganske, I., Zabner, J., and Welsh, M. J. (2002). Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* **110**(6), 789-99.
- Wickham, T. J., Mathias, P., Cheresh, D. A., and Nemerow, G. R. (1993). Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* **73**(2), 309-19.
- Wriggers, W. and Birmanns, S. (2001) Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J Struct Biol*, **133**, 193-202.
- Wu, E., Pache, L., Von Seggern, D. J., Mullen, T. M., Mikyas, Y., Stewart, P. L., and Nemerow, G. R. (2003). Flexibility of the adenovirus fiber is required for efficient receptor interaction. *J Virol* **77**(13), 7225-35.
- Xia, D., Henry, L.J., Gerard, R.D. & Deisenhofer, J. (1994). Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution. *Structure*, **2**, 1259-1270.
- Zakowski, J. J., Petri, W., Jr., and Wagner, R. R. (1981). Role of matrix protein in assembling the membrane of vesicular stomatitis virus : reconstitution of matrix protein with negatively charged phospholipid vesicles. *Biochemistry* **20**, 3902-3907.
- Zhang, Y., and Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus receptors. *J Virol* **79**(19), 12125-31.

Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. (2005). The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell*. **17(1)** : 121-35.