

Université de Sherbrooke

Identification de ligands de la protéase adénovirale de type 2

à l'aide d'une peptothèque de phages ("phage library")

par

Gabrielle S. Girouard

Microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en microbiologie.

le 29 juin, 1995



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-612-09471-5

Canada

Nom :

Dissertation Abstracts International est organisé en catégories de sujets. Veuillez s.v.p. choisir le sujet qui décrit le mieux votre thèse et inscrivez le code numérique approprié dans l'espace réservé ci-dessous.

0307

U·M·I

CODE DE SUJET

SUJET

Catégories par sujets

HUMANITÉS ET SCIENCES SOCIALES

COMMUNICATIONS ET LES ARTS

Architecture	0729
Beaux-arts	0357
Bibliothéconomie	0399
Cinéma	0900
Communication verbale	0459
Communications	0708
Danse	0378
Histoire de l'art	0377
Journalisme	0391
Musique	0413
Sciences de l'information	0723
Théâtre	0465

ÉDUCATION

Généralités	515
Administration	0514
Art	0273
Collèges communautaires	0275
Commerce	0688
Économie domestique	0278
Éducation permanente	0516
Éducation préscolaire	0518
Éducation sanitaire	0680
Enseignement agricole	0517
Enseignement bilingue et multiculturel	0282
Enseignement industriel	0521
Enseignement primaire	0524
Enseignement professionnel	0747
Enseignement religieux	0527
Enseignement secondaire	0533
Enseignement spécial	0529
Enseignement supérieur	0745
Évaluation	0288
Finances	0277
Formation des enseignants	0530
Histoire de l'éducation	0520
Langues et littérature	0279

Lecture	0535
Mathématiques	0280
Musique	0522
Orientation et consultation	0519
Philosophie de l'éducation	0998
Physique	0523
Programmes d'études et enseignement	0727
Psychologie	0525
Sciences	0714
Sciences sociales	0534
Sciences de l'éducation	0340
Technologie	0710

LANGUE, LITTÉRATURE ET LINGUISTIQUE

Langues	
Généralités	0679
Anciennes	0289
Linguistique	0290
Modernes	0291
Littérature	
Généralités	0401
Anciennes	0294
Comparée	0295
Médiévale	0297
Moderne	0298
Africaine	0316
Américaine	0591
Anglaise	0593
Asiatique	0305
Canadienne (Anglaise)	0352
Canadienne (Française)	0355
Germanique	0311
Latino-américaine	0312
Moyen-orientale	0315
Romane	0313
Slave et est-européenne	0314

PHILOSOPHIE, RELIGION ET

THEOLOGIE

Philosophie	0422
Religion	
Généralités	0318
Clergé	0319
Études bibliques	0321
Histoire des religions	0320
Philosophie de la religion	0322
Théologie	0469

SCIENCES SOCIALES

Anthropologie	
Archéologie	0324
Culturelle	0326
Physique	0327
Droit	0398
Économie	
Généralités	0501
Commerce-Affaires	0505
Économie agricole	0503
Économie du travail	0510
Finances	0508
Histoire	0509
Théorie	0511
Études américaines	0323
Études canadiennes	0385
Études féministes	0453
Folklore	0358
Géographie	0366
Gérontologie	0351
Gestion des affaires	
Généralités	0310
Administration	0454
Banques	0770
Comptabilité	0272
Marketing	0338
Histoire	
Histoire générale	0578

Ancienne	0579
Médiévale	0581
Moderne	0582
Histoire des noirs	0328
Africaine	0331
Canadienne	0334
États-Unis	0337
Européenne	0335
Moyen-orientale	0333
Latino-américaine	0336
Asie, Australie et Océanie	0332
Histoire des sciences	0585
Loisirs	0814
Planification urbaine et régionale	0999
Science politique	
Généralités	0615
Administration publique	0617
Droit et relations internationales	0616
Sociologie	
Généralités	0626
Aide et bien-être social	0630
Criminologie et établissements pénitentiaires	0627
Démographie	0938
Études de l'individu et de la famille	0628
Études des relations interethniques et des relations raciales	0631
Structure et développement social	0700
Théorie et méthodes	0344
Travail et relations industrielles	0629
Transports	0709
Travail social	0452

SCIENCES ET INGÉNIERIE

SCIENCES BIOLOGIQUES

Agriculture	
Généralités	0473
Agronomie	0285
Alimentation et technologie alimentaire	0359
Culture	0479
Élevage et alimentation	0475
Exploitation des pâturages	0777
Pathologie animale	0476
Pathologie végétale	0480
Physiologie végétale	0817
Sylviculture et faune	0478
Technologie du bois	0746
Biologie	
Généralités	0306
Anatomie	0287
Biologie (Statistiques)	0308
Biologie moléculaire	0307
Botanique	0309
Cellule	0379
Ecologie	0329
Entomologie	0353
Génétique	0369
Limnologie	0793
Microbiologie	0410
Neurologie	0317
Océanographie	0416
Physiologie	0433
Radiation	0821
Science vétérinaire	0778
Zoologie	0472
Biophysique	
Généralités	0786
Medicale	0760

Géologie	0372
Géophysique	0373
Hydrologie	0388
Minéralogie	0411
Océanographie physique	0415
Paléobotanique	0345
Paléocologie	0426
Paléontologie	0418
Paléozoologie	0985
Palynologie	0427

SCIENCES DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT

Économie domestique	0386
Sciences de l'environnement	0768
Sciences de la santé	
Généralités	0566
Administration des hôpitaux	0769
Alimentation et nutrition	0570
Audiologie	0300
Chimiothérapie	0992
Dentisterie	0567
Développement humain	0758
Enseignement	0350
Immunologie	0982
Loisirs	0575
Médecine du travail et thérapie	0354
Médecine et chirurgie	0564
Obstétrique et gynécologie	0380
Ophtalmologie	0381
Orthophonie	0460
Pathologie	0571
Pharmacie	0572
Pharmacologie	0419
Physiothérapie	0382
Radiologie	0574
Santé mentale	0347
Santé publique	0573
Soins infirmiers	0569
Toxicologie	0383

SCIENCES PHYSIQUES

Sciences Pures

Chimie	
Généralités	0485
Biochimie	487
Chimie agricole	0749
Chimie analytique	0486
Chimie minérale	0488
Chimie nucléaire	0738
Chimie organique	0490
Chimie pharmaceutique	0491
Physique	0494
Polymères	0495
Radiation	0754
Mathématiques	0405
Physique	
Généralités	0605
Acoustique	0986
Astronomie et astrophysique	0606
Électronique et électricité	0607
Fluides et plasma	0759
Météorologie	0608
Optique	0752
Particules (Physique nucléaire)	0798
Physique atomique	0748
Physique de l'état solide	0611
Physique moléculaire	0609
Physique nucléaire	0610
Radiation	0756
Statistiques	0463

Sciences Appliquées Et Technologie

Informatique	0984
Ingénierie	
Généralités	0537
Agricole	0539
Automobile	0540

Biomédicale	0541
Chaleur et thermodynamique	0348
Conditionnement (Emballage)	0549
Génie aérospatial	0538
Génie chimique	0542
Génie civil	0543
Génie électronique et électrique	0544
Génie industriel	0546
Génie mécanique	0548
Génie nucléaire	0552
Ingénierie des systèmes	0790
Mécanique navale	0547
Métallurgie	0743
Science des matériaux	0794
Technique du pétrole	0765
Technique minière	0551
Techniques sanitaires et municipales	0554
Technologie hydraulique	0545
Mécanique appliquée	0346
Géotechnologie	0428
Matériaux plastiques (Technologie)	0795
Recherche opérationnelle	0796
Textiles et tissus (Technologie)	0794

PSYCHOLOGIE

Généralités	0621
Personnalité	0625
Psychobiologie	0349
Psychologie clinique	0622
Psychologie du comportement	0384
Psychologie du développement	0620
Psychologie expérimentale	0623
Psychologie industrielle	0624
Psychologie physiologique	0989
Psychologie sociale	0451
Psychométrie	0632



Name _____

Dissertation Abstracts International is arranged by broad, general subject categories. Please select the one subject which most nearly describes the content of your dissertation. Enter the corresponding four-digit code in the spaces provided.

				U·M·I
--	--	--	--	-------

SUBJECT TERM

SUBJECT CODE

Subject Categories

THE HUMANITIES AND SOCIAL SCIENCES

COMMUNICATIONS AND THE ARTS

Architecture	0729
Art History	0377
Cinema	0900
Dance	0378
Fine Arts	0357
Information Science	0723
Journalism	0391
Library Science	0399
Mass Communications	0708
Music	0413
Speech Communication	0459
Theater	0465

EDUCATION

General	0515
Administration	0514
Adult and Continuing	0516
Agricultural	0517
Art	0273
Bilingual and Multicultural	0282
Business	0688
Community College	0275
Curriculum and Instruction	0727
Early Childhood	0518
Elementary	0524
Finance	0277
Guidance and Counseling	0519
Health	0680
Higher	0745
History of	0520
Home Economics	0278
Industrial	0521
Language and Literature	0279
Mathematics	0280
Music	0522
Philosophy of	0998
Physical	0523

Psychology	0525
Reading	0535
Religious	0527
Sciences	0714
Secondary	0533
Social Sciences	0534
Sociology of	0340
Special	0529
Teacher Training	0530
Technology	0710
Tests and Measurements	0288
Vocational	0747

LANGUAGE, LITERATURE AND LINGUISTICS

Language	
General	0679
Ancient	0289
Linguistics	0290
Modern	0291
Literature	
General	0401
Classical	0294
Comparative	0295
Medieval	0297
Modern	0298
African	0316
American	0591
Asian	0305
Canadian (English)	0352
Canadian (French)	0355
English	0593
Germanic	0311
Latin American	0312
Middle Eastern	0315
Romance	0313
Slavic and East European	0314

PHILOSOPHY, RELIGION AND THEOLOGY

Philosophy	0422
Religion	
General	0318
Biblical Studies	0321
Clergy	0319
History of	0320
Philosophy of	0322
Theology	0469

SOCIAL SCIENCES

American Studies	0323
Anthropology	
Archaeology	0324
Cultural	0326
Physical	0327
Business Administration	
General	0310
Accounting	0272
Banking	0770
Management	0454
Marketing	0338
Canadian Studies	0385
Economics	
General	0501
Agricultural	0503
Commerce-Business	0505
Finance	0508
History	0509
Labor	0510
Theory	0511
Folklore	0358
Geography	0366
Gerontology	0351
History	
General	0578

Ancient	0579
Medieval	0581
Modern	0582
Black	0328
African	0331
Asia, Australia and Oceania	0332
Canadian	0334
European	0335
Latin American	0336
Middle Eastern	0333
United States	0337
History of Science	0585
Law	0398
Political Science	
General	0615
International Law and Relations	0616
Public Administration	0617
Recreation	0814
Social Work	0452
Sociology	
General	0626
Criminology and Penology	0627
Demography	0938
Ethnic and Racial Studies	0631
Individual and Family Studies	0628
Industrial and Labor Relations	0629
Public and Social Welfare	0630
Social Structure and Development	0700
Theory and Methods	0344
Transportation	0709
Urban and Regional Planning	0999
Women's Studies	0453

THE SCIENCES AND ENGINEERING

BIOLOGICAL SCIENCES

Agriculture	
General	0473
Agronomy	0285
Animal Culture and Nutrition	0475
Animal Pathology	0476
Food Science and Technology	0359
Forestry and Wildlife	0478
Plant Culture	0479
Plant Pathology	0480
Plant Physiology	0817
Range Management	0777
Wood Technology	0746
Biology	
General	0306
Anatomy	0287
Biostatistics	0308
Botany	0309
Cell	0379
Ecology	0329
Entomology	0353
Genetics	0369
Limnology	0793
Microbiology	0410
Molecular	0307
Neuroscience	0317
Oceanography	0416
Physiology	0433
Radiation	0821
Veterinary Science	0778
Zoology	0472
Biophysics	
General	0786
Medical	0760

Geodesy	0370
Geology	0372
Geophysics	0373
Hydrology	0388
Mineralogy	0411
Paleobotany	0345
Paleoecology	0426
Paleontology	0418
Paleozoology	0985
Palyology	0427
Physical Geography	0368
Physical Oceanography	0415

HEALTH AND ENVIRONMENTAL SCIENCES

Environmental Sciences	0768
Health Sciences	
General	0566
Audiology	0300
Chemotherapy	0992
Dentistry	0567
Education	0350
Hospital Management	0769
Human Development	0758
Immunology	0982
Medicine and Surgery	0564
Mental Health	0347
Nursing	0569
Nutrition	0570
Obstetrics and Gynecology	0380
Occupational Health and Therapy	0354
Ophthalmology	0381
Pathology	0571
Pharmacology	0419
Pharmacy	0572
Physical Therapy	0382
Public Health	0573
Radiology	0574
Recreation	0575

Speech Pathology	0460
Toxicology	0383
Home Economics	0386

PHYSICAL SCIENCES

Pure Sciences	
Chemistry	
General	0485
Agricultural	0749
Analytical	0486
Biochemistry	0487
Inorganic	0488
Nuclear	0738
Organic	0490
Pharmaceutical	0491
Physical	0494
Polymer	0495
Radiation	0754
Mathematics	0405
Physics	
General	0605
Acoustics	0986
Astronomy and Astrophysics	0606
Atmospheric Science	0608
Atomic	0748
Electronics and Electricity	0607
Elementary Particles and High Energy	0798
Fluid and Plasma	0759
Molecular	0609
Nuclear	0610
Optics	0752
Radiation	0756
Solid State	0611
Statistics	0463
Applied Sciences	
Applied Mechanics	0346
Computer Science	0984

Engineering	
General	0537
Aerospace	0538
Agricultural	0539
Automotive	0540
Biomedical	0541
Chemical	0542
Civil	0543
Electronics and Electrical	0544
Heat and Thermodynamics	0348
Hydraulic	0545
Industrial	0546
Marine	0547
Materials Science	0794
Mechanical	0548
Metallurgy	0743
Mining	0551
Nuclear	0552
Packaging	0549
Petroleum	0765
Sanitary and Municipal	0554
System Science	0790
Geotechnology	0428
Operations Research	0796
Plastics Technology	0795
Textile Technology	0994

PSYCHOLOGY

General	0621
Behavioral	0384
Clinical	0622
Developmental	0620
Experimental	0623
Industrial	0624
Personality	0625
Physiological	0989
Psychobiology	0349
Psychometrics	0632
Social	0451



TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	ii
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	iv
LISTE DES ABREVIATIONS.....	v
RESUME	
1. INTRODUCTION	
1.1. GENERALITES SUR LES ADENOVIRUS	1
1.2. GENERALITES SUR LA PROTEASE ADENOVIRALE DU TYPE 2.....	4
1.3. GENERALITES SUR LES PEPTOTHEQUES DE PHAGES (PHAGE LIBRARY).....	5
1.4. BUT DU PROJET	8
2. MATERIELS ET METHODES	
2.1. PREPARATION DE LA PEPTOTHEQUE	
2.1.1. CONSTRUCTION DE LA PEPTOTHEQUE DE PHAGES.....	10
2.1.2. AMPLIFICATION DE LA PEPTOTHEQUE DE PHAGES.....	12
2.2. PREPARATION DE LA PROTEASE ADENOVIRALE	
2.2.1. PURIFICATION DE LA PROTEASE.....	13
2.2.2. INSOLUBILISATION DE LA PROTEASE.....	14
2.2.3. PREPARATION DU SUBSTRAT.....	14
2.2.4. TEST D'ACTIVITE DE LA PROTEASE INSOLUBILISEE.....	15
2.3. CRIBLAGE DE LA PEPTOTHEQUE DE PHAGE	
2.3.1. CRIBLAGE DE LA PEPTOTHEQUE CONTRE LA PROTEASE ADENOVIRALE.....	15
2.3.2. TITRE DES ELUATS ET DE LA PEPTOTHEQUE UTILISEE.....	16
2.3.3. AMPLIFICATION DE L'ELUAT A pH 3,0.....	16

2.4. IDENTIFICATION DES PEPTIDES SELECTIONNES	
2.4.1. ISOLEMENT DES PHAGES.....	17
2.4.2. EXTRACTION DE L'ADN SIMPLE BRIN.....	18
2.4.3. SEQUENCAGE DE L'ADN SIMPLE BRIN.....	18
2.5. RECHERCHE AVEC LE LOGICIEL BLAST.....	19
3. RESULTATS	
3.1. ACTIVITE DE LA PROTEASE ADENOVIRALE DE TYPE 2 INSOLUBILISEE..	20
3.2. CRIBLAGE DE LA PEPTOTHEQUE A LA PROTEASE ADENOVIRALE	
3.2.1. RENDEMENT DU CRIBLAGE.....	20
3.2.2. PEPTIDES SELECTIONNES LORS DU CRIBLAGE.....	23
3.3. ETUDE DES PEPTIDES IDENTIFIES A PARTIR DES BANQUES DE DONNEES	
3.3.1. BANQUE DE DONNEES SWISSPROT.....	29
3.3.2. BANQUE DE DONNEES GENBANK.....	31
4. DISCUSSION.....	35
ANNEXE 1: TABLEAU DES ABREVIATIONS DES ACIDES AMINES.....	43
ANNEXE 2: RESULTATS DE LA RECHERCHE AVEC LE LOGICIEL BLAST.....	44
REMERCIEMENTS.....	52
BIBLIOGRAPHIE.....	54

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-Structure de l'adénovirus et le profil des protéines constitutives sur gel PAGE-SDS.....	3
FIGURE 2-Illustration d'une peptothèque de phages, site de clonage de la séquence aléatoire dans le gène de la protéine III ainsi que l'expression du peptide dans la protéine III.....	7
FIGURE 3-Construction de la peptothèque de phages dans le vecteur du phage filamenteux fUSE 5.....	11
FIGURE 4- Test d'activité de la protéase insolubilisée.....	21
FIGURE 5-Pourcentage de rendement aux différents éluats de pH de chaque ronde de sélection.....	24
FIGURE 6-Pourcentage de rendement de l'éluat à pH 3,0 (pH de sélection) aux quatre rondes de sélection.....	25
FIGURE 7-Alignement des séquences de la protéine de 100kD des différents types d'adénovirus en comparaison avec la séquence du peptide 21 (cl21) provenant du phage sélectionné de la peptothèque.....	32
FIGURE 8-Modèle du mécanisme de transport de la protéase adénovirale.....	41

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-Les différentes pathologies possibles causées par les différents types d'adénovirus.....	2
TABLEAU 2-Séquences des peptides des phages isolés à partir du criblage de la peptothèque de phages contre la protéase recombinante adénovirale de type 2.....	26
TABLEAU 3-Tableau des séquences du produit pVIct chez les différents types d'adénovirus.....	28
TABLEAU 4-Homologies retrouvées entre les peptides des phages sélectionnés pour la protéase adénovirale et les séquences protéiques obtenues à partir de la banque de données Swissprot, et la fonction blastp du logiciel Blast.....	30
TABLEAU 5-Homologies retrouvées entre les peptides des phages sélectionnés pour la protéase adénovirale et les séquences protéiques obtenues à partir de la banque de données Genbank, et la fonction tblastn du logiciel Blast.....	34
TABLEAU 6-Comparaison de la composition en acides aminés des peptides des phages sélectionnés par la protéase avec les acides aminés qui sont retrouvés comme étant responsable de la liaison entre une série de protéines et leurs ligands correspondants selon Villar et Kauvar (1994).....	37

ABREVIATIONS

a.a.	Acide aminé
Ad2	Adénovirus type 2
Ad2-ts1	Mutant thermosensible 1 de l'adénovirus type 2
ADN	Acide déoxyribonucléique
ADNc	Acide déoxyribonucléique complémentaire
dATP	Déoxyadénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BPTI	Inhibiteur de la trypsine pancréatique du bovin
BSA	Albumine sérique bovine
°C	Degré Celcius
D.O.	Densité optique
DTT	OL-Dithiothréitol
E1a	Protéine précoce de l'adénovirus
EDTA	Ethylènediamine tétraacétate
g	Gramme
h	Heure
Kan	Kanamycine
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
krpm	Kilo rotation par minute
l	Litre
L3	Gène tardif de l'adénovirus
M	Molaire
mA	Milliampère
min	Minute
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
PAGE-SDS	Gel d'électrophorèse de polyacrylamide-dodecyl sulfate de sodium
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérase en chaîne
PEG	Polyéthylèneglycol
pIII	Protéine III du phage filamenteux
pVI	Protéine précurseur de l'adénovirus

pVIc	Produit du clivage de la protéine pVI par la protéase adénovirale a l'extremite C-terminale.
p/v	Rapport poids/volume
rpm	Rotation par minute
Tc, tet	Tétracycline
TBS	Tampon tris salin
TNF	Facteur de nécrose tumorale
TU	Unité de transduction
ug	Microgramme
ul	Microlitre
V	Volt
VI	Protéine mature de l'adénovirus
v/v	Rapport volume/volume

RESUME

Une peptothèque de phages a été utilisée afin d'identifier des ligands à la protéase de l'Ad2. La peptothèque de phages contient une région aléatoire de 15 a.a. bordée par deux résidus cystéine qui forment un pont disulfure. Le criblage de la peptothèque contre la protéase de l'Ad2, a dégagé 29 séquences de peptides de 15 a.a. de longueur à partir de 63 phages vérifiés. Parmi ces séquences, il a été possible de distinguer certaines séquences connues, telles les sites de clivage de la protéase (M,I,L)XGG^X et (M,I,L)XGX^G. Une séquence homologue au peptide pVIct, un stimulateur de la protéase, a aussi été mise en évidence. Une région de grande homologie entre plusieurs des séquences obtenues met en évidence une séquence qui ressemble au site de clivage, cette séquence étant VEGGS. Le peptide VEGGS a été synthétisé afin de vérifier son effet sur la protéase *in vitro* et *in vivo*. A partir d'une recherche avec le logiciel Blast dans les banques de données Swissprot et Genbank, l'homologie entre les protéines avec les séquences provenant des phages isolés ont été relevées. Parmi les séquences protéiques obtenues de ces banques de données, on observe une homologie avec la protéine 100kD et la protéine Tp de l'Ad2, ainsi qu'une homologie avec la protéine Tp de l'Ad5.

1. INTRODUCTION

1.1. GENERALITES SUR LES ADENOVIRUS

L'adénovirus a été découvert dans les tissus adénoïdes de patients souffrant de malaises respiratoires (Rowe *et al.*, 1953), l'organisme causant une dégradation des tissus en culture. Afin de pouvoir mieux discuter de l'organisme en question, le terme adénovirus, dérivé du tissu adénoïde, lui a été donné (Enders *et al.*, 1956).

L'adénovirus est responsable de certains malaises respiratoires, la conjonctivite et des malaises gastroentériques. La famille des adénovirus comprend 93 membres qui sont responsables de divers malaises (voir le tableau 1). L'adénovirus est de forme icosaédrale, est non-enveloppé et possède un génome à ADN double brin de 36kb encapsidé (figure 1). Lors de l'infection, le virus pénètre dans la cellule susceptible par endocytose et est amenée au cytoplasme. Le génome se rend au noyau de la cellule infectée, pénètre dans le noyau par les pores nucléaires, mais le génome n'est pas intégré dans celui de la cellule hôte. Les deux brins d'ADN sont codants chez l'adénovirus et la réplication du génome se fait dans le noyau de la cellule à l'aide de la protéine précurseur terminale (pTP). Cette protéine agit comme une amorce à la polymérase virale et assure la réplication de l'ADN viral. La transcription et l'expression des protéines virales se fait en deux phases, une phase précoce et une phase tardive. Les protéines précoces E1a, E1b, E2, E3 et E4 sont responsables du contrôle de la cellule hôte où la synthèse des protéines et le cycle cellulaire sont ralenti afin d'assurer la survie du virus. La phase tardive assure la synthèse des protéines structurales du virus ainsi que de certaines protéines vitales tel la protéine de 52kDa, qui agit comme un échafaud, et la protéase adénovirale qui est nécessaire à l'infectivité de l'adénovirus (Dulbecco et Ginsberg, 1988).

<i>Disease Syndrome</i>	<i>Adenovirus Type</i>	
	<i>Most Common</i>	<i>Less Common</i>
Acute respiratory disease of recruits	4, 7	3, 11, 14, 21
Pharyngoconjunctival fever; pharyngitis	3	5, 7, 21
Conjunctivitis	3, 7	2, 5, 6, 9, 10, 11
Epidemic keratoconjunctivitis	8, 19	37
Nonbacterial pneumonia of infants*	7	
Acute infantile gastroenteritis	40, 41	
Acute hemorrhagic cystitis*	11	

* Least common of the diseases produced

TABLEAU 1-Les différentes pathologies possibles causées par les différents types d'adénovirus.

(Tiré de Dulbecco et Ginsberg, 1988)

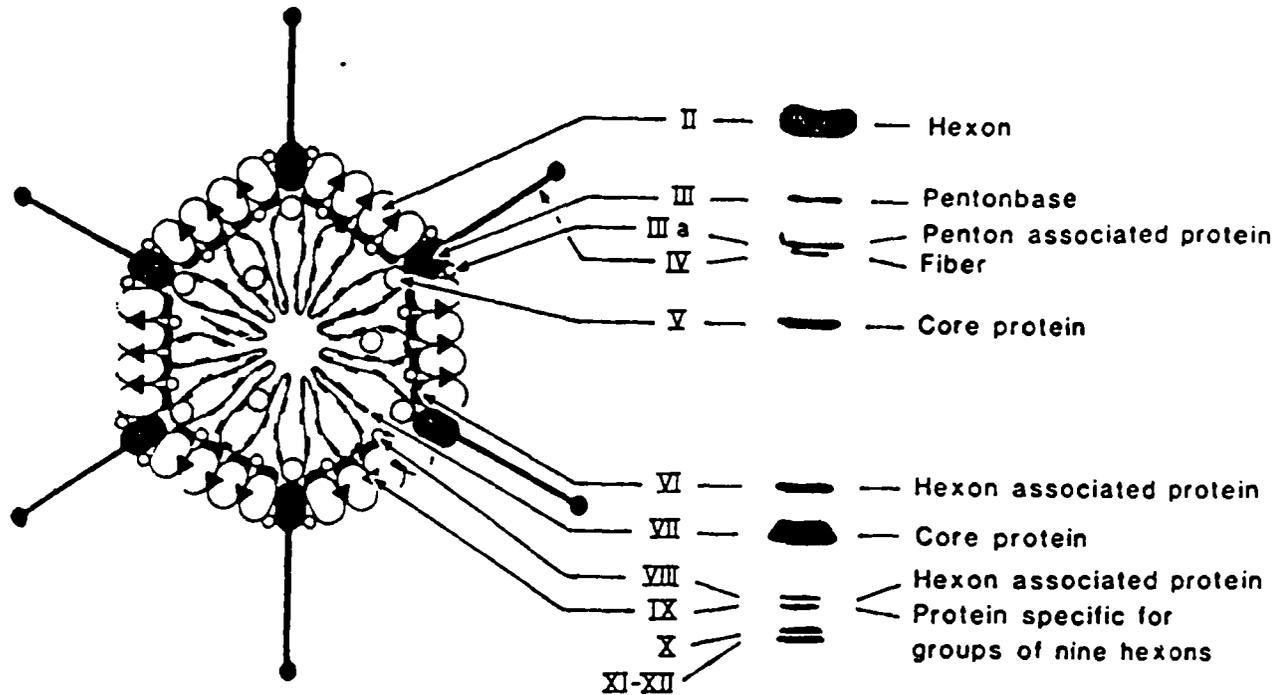


FIGURE 1-Structure de l'adénovirus et le profil des protéines constitutives sur gel PAGE-SDS.

La capside est formée des protéines II, III, IIIa, IV, VI, VIII et IX. La partie centrale contient les protéines V, VII, u et pTP qui est lié à l'ADN (Tiré de Fields et Horwitz, 1985).

1.2. GENERALITES SUR LA PROTEASE ADENOVIRALE DU TYPE 2

L'adénovirus code pour une protéase de 23kDa dans le gène tardif L3. Cette protéase est une cystéine protéase, ce qui a été déterminé à l'aide des inhibiteurs connus qui agissent sur diverses protéases (Webster *et al.*, 1989b; Webster et Kemp, 1993; Tihany *et al.*, 1993). La protéase adénovirale est active sous forme d'un monomère qui reconnaît deux sites de clivages (M,I,L)XGG[^]X et (M,I,L)XGX[^]G, où "[^]" indique le lien peptidique coupé (Webster *et al.*, 1989a; Weber, 1990). Le site actif de cette protéase est reconnu comme étant les résidus cystéine 104 et histidine 54, le troisième résidu n'étant pas encore déterminé. On soupçonne cependant qu'il s'agisse d'un résidu asparagine, aspartate ou glutamine (Rancourt *et al.*, 1993).

Les substrats de la protéase adénovirale ne se limitent pas seulement aux protéines virales (pVI, pVII, pVIII, L2-79R, pTP, L1-52k et IIIa), mais aussi à certaines protéines cellulaires, telles que les cytokératines K18 et K7.(Chen *et al.*, 1993; Weber et Tihany, 1995). L'une des protéines virales, pVI, présente deux sites de clivage qui se retrouvent respectivement à l'extrémité N-terminale et C-terminale. Les deux sites de clivage sont retrouvés, le site MXGG[^]X est coupé à l'acide aminé 33 dans la région N-terminale de la protéine. Un deuxième site IXGX[^]G est coupé à l'a.a. 239 qui se trouve dans la région C-terminale de la protéine.(Weber et Tihanyi, 1994) Le clivage du site de la région C-terminale dégage un peptide de 11 acides aminés connu comme étant pVIct. Ce peptide semble influencer l'activité *in vitro* de la protéase (Webster *et al.*, 1993; Mangel *et al.*, 1993).

La genèse du virus mature se fait en plusieurs phases identifiées par des particules immatures. Ces particules immatures ont une capsidie formée des protéines virales sous leur forme précurseur, mais elles ne sont pas infectieuses. Afin d'avoir un virus infectieux, les

protéines virales doivent être sous leur forme mature. La protéase chez l'adénovirus est responsable de la maturation de ces virions immatures: elle reconnaît les sites de clivage retrouvés chez les protéines précurseurs afin d'assurer la forme mature des protéines.

Le mutant thermosensible Ad2-ts1 a mis en évidence l'importance de la protéase adénovirale (Weber, 1976). Ce mutant, à 39°C, produit seulement des particules non infectieuses, mais les capsides sont toujours formées. À la température permissive de 33°C, les particules de ce mutant sont infectieuses. La mutation est exprimée dans le gène L3 de la protéase de 23kD, où la proline 137 est substituée par une leucine (P137L). Ce mutant indique que la protéase n'est pas nécessaire à l'assemblage de la capside mais plutôt à la décapsidation du virus lors de l'infection, ce qui explique l'absence d'infectivité chez le mutant à la température non permissive (Mirza et Weber, 1980; Hannan *et al.*, 1983). Cette mutation ne semble tout de même pas influencer l'activité de la protéase mais plutôt le transport de cette protéine vers son substrat. La maturation des protéines précurseurs assure l'infectivité de la particule virale mature. La présence du peptide pVIct dans le milieu, lors d'une infection du mutant Ad2-ts1, récupère l'activité de la protéase mutante, où plutôt le peptide assure le transport de la protéase mutante qui peut ensuite agir sur les protéines précurseurs (Rancourt *et al.*, 1995).

1.3. GENERALITES SUR LES PEPTOTHEQUES DE PHAGES (PHAGE LIBRARIES)

Les peptothèques de phages sont souvent utilisées afin d'identifier un ligand à une cible quelconque. Les peptothèques de phages sont construites en produisant une protéine de fusion avec un épitope, qui varie en longueur et qui est de séquence aléatoire, avec la protéine codée par le gène III du phage filamenteux. La protéine III du phage filamenteux est retrouvées en 3 à 5 copies seulement. La structure physique de cette protéine ressemble à une fibre qui est ancré par sa région C-terminale à une extrémité du phage. La région N-

terminale de cette protéine ressemble à un boule qui est projeté du phage. La construction de la peptothèque exprime l'épitope en fusion avec la région N-terminale de la protéine. L'épitope est donc exposé au milieu environnant et permet une interaction entre l'épitope et la cible (figure 2). La protéine III (pIII) est nécessaire à l'absorption du phage dans le pili de la bactérie masculine par la région N-terminale. Il a été démontré que la fusion de la protéine avec l'épitope n'influence pas l'infectivité du phage et que l'épitope reste accessible (Parmley et Smith, 1988). Ces peptothèques ont été utilisées dans divers buts afin d'identifier, par exemple, l'épitope d'un anticorps (Scott et Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990; Christian *et al.*, 1992; Arsenault et Weber, 1993) et des ligands aux protéines (Devlin *et al.*, 1990; Goodson *et al.*, 1994). Il existe aussi des peptothèques spécifiques qui sont construites à partir de dérivés de séquences connues plutôt qu'aléatoires. Le groupe de Roberts *et al.* (1992) a construit une peptothèque dérivée de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique du bovin (BPTI) afin d'identifier un inhibiteur dérivé du BPTI à l'élastase neutrophile humaine. Il existe aussi des peptothèques qui ont été construites afin d'être utilisées comme substrats d'une protéase (Matthews et Wells, 1993). Ces peptothèques permettent donc d'isoler toutes les possibilités de séquences des sites de clivage possibles pour une protéase quelconque.

Les peptothèques de phages sont pratiques à utiliser puisque les phages peuvent être facilement amplifiés en grand nombre, de 10^3 phages jusqu'à environ 10^{10} phages. De plus, le génome à ADN simple brin qui contient la séquence du peptide sélectionné est facilement obtenu et déterminé. Ces peptothèques de phages permettent de déterminer des séquences qui lient la cible. Ces séquences peuvent être des épitopes que l'on peut reconnaître, ou bien encore ce qui est connu comme des mimotopes. Un mimotope est une séquence d'acides aminés qui ne ressemble pas à la séquence d'acides aminés de l'épitope en question, mais présente une structure tridimensionnelle semblable ou plutôt équivalente. Le groupe de Smith *et al.* (1993) a mis en évidence ce phénomène en observant un peptide

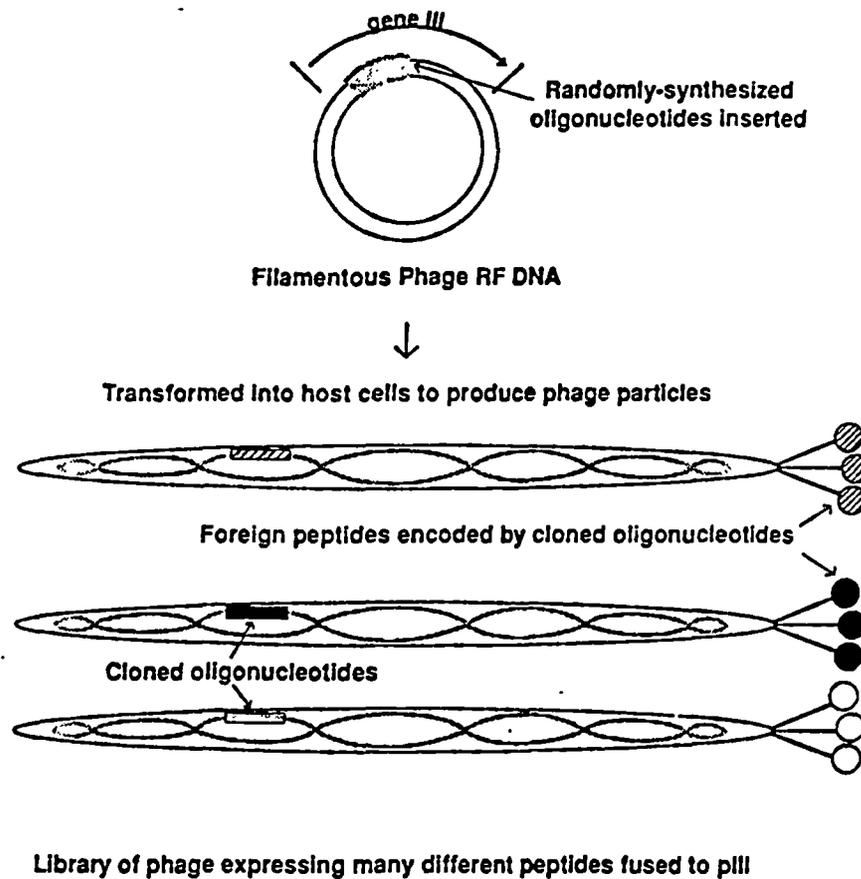


FIGURE 2-Illustration d'une peptothèque de phages. le site de clonage de la séquence aléatoire dans le gène de la protéine III ainsi que l'expression du peptide dans la protéine III.

(Tiré de Dower et Fodor, 1991)

antagoniste au peptide-S qui ne ressemble pas à celui-ci au niveau de la séquence d'acides aminés, mais influence tout de même l'enzyme de la même manière que le peptide naturel, il peut donc être considéré comme un mimotope.

1.4. BUT DU PROJET

Mon projet de maîtrise consiste à identifier des ligands de la protéase adénovirale du type 2. Ces ligands peuvent nous donner certaines informations au niveau de la structure de notre protéine étudiée, ainsi que de mettre en évidence certains domaines fonctionnels possibles et puis éclaircir son mécanisme d'action qui n'est pas encore complètement compris. En général, un ligand peut influencer sa cible, la protéase dans ce cas, au niveau de son activité, soit en influençant sa structure tridimensionnelle ou en bloquant le site actif de la protéine. L'activité de la protéase peut donc être inhibée, stimulée, ou bien l'influence du ligand n'est pas discernée dans notre système de vérification.

Le mécanisme de maturation, accompli par la protéase adénovirale, est retrouvé chez toutes les souches d'adénovirus. De plus, la séquence d'acides aminés de la protéase est assez homogène chez les différents types d'adénovirus (Houde et Weber, 1990). La protéase devient donc une cible afin de combattre une infection de l'adénovirus. De plus, différents ligands peuvent nous guider afin de mieux comprendre le mécanisme utilisé par la protéase ainsi que celui de l'adénovirus. Il est aussi intéressant qu'un inhibiteur isolé à partir de la protéase de l'adénovirus type 2 puisse possiblement inhiber les protéases des autres types d'adénovirus dû à la grande homologie entre les diverses espèces de l'adénovirus, ce qui devient intéressant au niveau clinique et thérapeutique. L'étude de la protéase adénovirale à partir des peptothèques de phages peut nous amener à mieux comprendre le virus et comment le combattre. De plus, l'adénovirus étant souvent utilisé comme vecteur de thérapie génique, une meilleure compréhension du virus et de sa protéase

peut rendre ce vecteur plus efficace afin de mieux combattre les maladies génétiques (Kozarsky et Wilson, 1993).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. PREPARATION DE LA PEPTOTHEQUE

2.1.1. CONSTRUCTION DE LA PEPTOTHEQUE DE PHAGES

La peptothèque de phages qui a été utilisée lors de ces expériences nous provient des laboratoires Merck (Pennsylvanie). Cette peptothèque est construite à partir du vecteur fUSE 5, qui est dérivé du vecteur fd-tet. Le vecteur fd-tet présente une résistance à la tétracycline (Tc) lors de l'insertion du transposon-10 dans la région non codante du génome du phage fd (Zacher *et al.*, 1980). Le vecteur fd-tet a été mutagénisé afin d'y insérer un site de clonage qui assure que le génome n'est pas transcrit dans le bon cadran de lecture et reste donc sous forme de plasmide (Scott et Smith, 1990). Un insert de bonne longueur dans le site de clonage permet un changement du cadran de lecture qui assure la transcription du génome phagique et ainsi la production de particules infectieuses.

Cette peptothèque a été construite avec un résidu cystéine de chaque côté de la séquence aléatoire de 15 a.a.. Ces cystéines assurent, par la formation d'un pont disulfure, la stabilité de la séquence aléatoire, c'est-à-dire que le peptide exprimé pourra prendre une seule conformation dû aux limites imposées par la formation du pont disulfure. La région aléatoire est construite à partir d'une réaction de PCR dégénérée avec les séquences (NNK)₁₅, où N correspond aux quatre bases A, C, G et T, et le K correspond aux bases G et T seulement, afin d'éliminer les deux codons stop UGA et UAA, mais chaque acide aminé est toujours représenté. L'insert obtenu de la réaction de PCR dégénérée est inséré dans le vecteur par les sites de l'enzyme de restriction Sfi I retrouvés dans le site de clonage du vecteur fUSE 5 (figure 3). Une peptothèque de 15 a.a. permet une grande complexité de

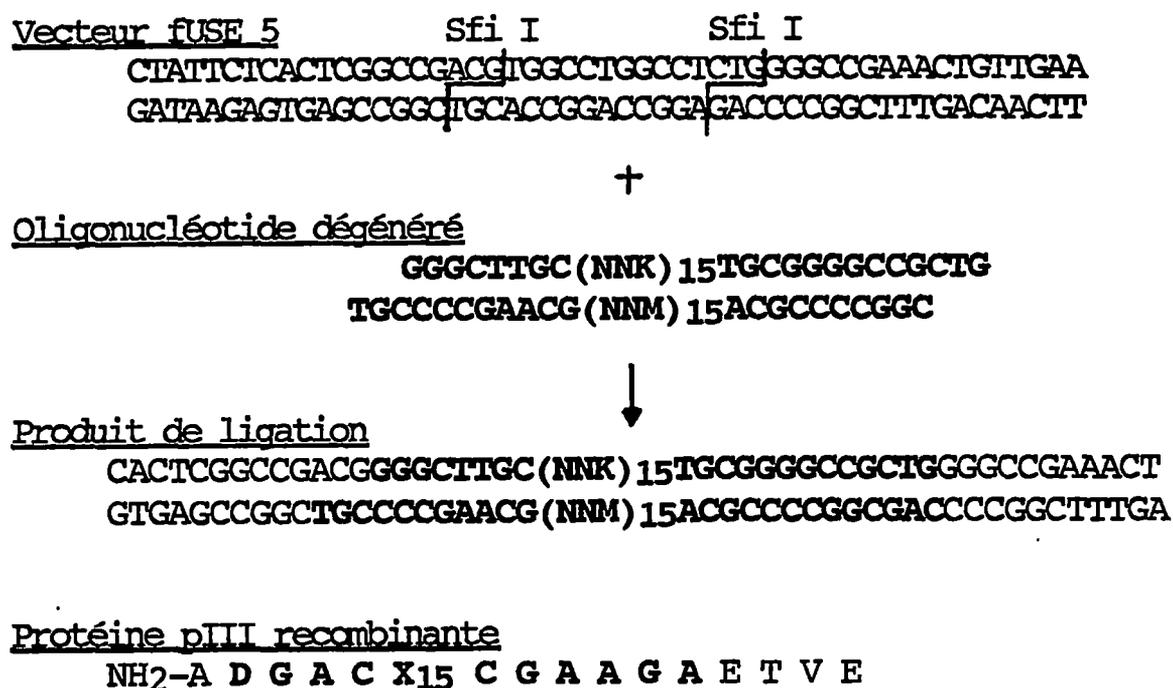


FIGURE 3-Construction de la peptothèque de phages dans le vecteur du phage filamenteux fUSE 5.

L'insertion de la région aléatoire dans la protéine est accomplie par l'intermédiaire des sites Sfi I du site de clonage du vecteur fUSE 5. L'insert, en caractères gras est produit par une réaction de PCR dégénéré d'une région de 15 a.a. qui est bordée par deux résidus cystéine qui forment un pont disulfure entre elles. Le PCR dégénéré est produit à partir de N qui correspond aux quatre bases possibles, A, C, G et T dans les deux premières positions. La lettre K représente les bases G et T dans la troisième position, et puis M représente les bases C et A correspondant à la séquence du premier brin. La région en caractères gras de la protéine recombinante démontre la région qui est exogène de la protéine III de type sauvage.

séquences possibles. Théoriquement il est possible d'obtenir une peptothèque avec une complexité de 3×10^{19} peptides différents.

2.1.2. AMPLIFICATION DE LA PEPTOTHEQUE DE PHAGE

Un volume de 100ml de milieu 2xYT (16g tryptone, 10g extrait de levure, 5g NaCl dans 1l) est inoculé avec une culture de bactéries K91Kan (Hfr-C, thi, kan^r, généreusement donné par G.P. Smith), incubé pendant 16 heures à 37°C et sous agitation pendant environ 3 h à 37°C jusqu'à une D.O. de 0,2 à partir d'une dilution 1:10 . Un volume de 10ul de la peptothèque (provenant des laboratoires Merck) est ensuite ajouté à cette culture et incubé pendant 20 min avec agitation à 37°C. On ajoute ensuite 100ml de cette culture à 1l de milieu 2xYT préchauffé à 37°C contenant 0.22ug/ml de Tc et on laisse incuber pendant 35 min avec agitation à 37°C. On recueille un échantillon de 10ul de cette culture avant d'ajouter la Tc à 20ug/ml et on laisse incuber à 37°C avec agitation pendant 16 h. L'échantillon de 10ul est dilué jusqu'à 10^{-4} ou 10^{-5} , 200ul de cette dilution sont étalés sur un pétri de 2xYT+1.5% d'agar contenant 40ug/ml de Tc et 100ug/ml de Kan, qu'on laisse incuber à 37°C pendant 16 h. On obtient environ 100 à 200 colonies sur le pétri lors d'une infection efficace.

La culture d'un litre est centrifugée à 3 500 rpm pendant 25 min à 4°C à l'aide du rotor Sorvall HG-4. Le surnageant est transféré dans 6 bouteilles à centrifugation de 250ml, centrifugé à 8 000 rpm pendant 10 min à 4°C à l'aide du rotor Sorvall SS34. Le surnageant est transféré dans des bouteilles à centrifugation de 250ml prépesées. Ces bouteilles contenant la culture sont pesées afin de déterminer le poids de la culture. On ajoute du PEG/NaCl (16.7% PEG 8 000/ 3,3M NaCl) à un volume de 15% du poids net de la culture. Le tout est inversé environ 100 fois afin de bien mélanger et incubé sur de la glace pendant 16 h.

Après l'incubation, le tout est centrifugé à 8 000 rpm pendant 40 min à 4°C à l'aide du rotor SS34. Le culot est dissout dans 30ml de TBS (50mM Tris, 150mM NaCl, pH 7,5) en l'agitant à 37°C pendant 30 min. La culture est transférée dans un tube Oakridge a fond rond et centrifugée à 15 krpm pendant 10 min à 4°C à l'aide du rotor SS34. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube Oakridge auquel on ajoute 4,5ml de PEG/NaCl. Le tube est inversé 100 fois et laissé sur glace pendant 1h. La culture est centrifugée à 17 krpm pendant 20 min à 4°C à l'aide du rotor SS34. Le culot est dissout dans 10ml de TBS et recentrifugé à 12 krpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est transféré dans un tube de 15ml. Le phage est placé dans du CsCl d'une densité de 1.30g/ml dans un tube de polyallomère qui est centrifugé à 37 krpm pendant 65 h à 4°C à l'aide du rotor SB283. La bande de phage est recueillie du CsCl et transférée dans un tube de 4mL, rempli avec du TBS, que l'on centrifuge à 50 krpm pendant 4 h à 4°C à l'aide du rotor SB405. Le culot est dissout en le gardant à 4°C pendant 16 h dans 2ml de TBS à l'aide d'un agitateur, on ajoute 0,02% NaN₃ (v/v). On conserve le stock à 4°C. Cette méthode donne un rendement d'environ 10¹² phages/ml.

2.2. PREPARATION DE LA PROTEASE

2.2.1. PURIFICATION DE LA PROTEASE

La protéase a été purifiée selon le protocole décrit dans l'article de Keyvani-Amineh *et al.* (1995).

2.2.2. LIAISON DE LA PROTEASE ADENOVIRALE PURIFIEE A LA BILLE

Le Réacti-Gel 6X de Pierce (Rockford, Illinois) contient le carbodiimidazole qui a pH 9,0 va réagir avec le bout aminé N-terminal de la protéase pour former un lien covalent entre la protéase et les billes. Les billes sont lavées avec de l'eau froide en centrifugeant dans une biofuge et le surnageant est enlevé afin d'éliminer l'acétone. Les billes sont lavées trois fois avec de l'eau froide. La protéase est gardée dans un tampon de couplage 0,1M borate à pH 9,0 à une concentration de 0,5mg de protéase par ml de billes lavées et mis en rotation à 4°C pendant 30 h sous azote. Le tube est ensuite centrifugé et le surnageant est recueilli afin de vérifier l'efficacité de la liaison de la protéase au gel à l'aide du réactif de Bradford (Bradford, 1976). Les sites de liaison qui n'auraient pas été utilisés sont ensuite bloqués avec une solution de Tris-HCl 1M pH 8,7, en rotation à 4°C pendant 4 h sous l'azote. Les billes sont ensuite lavées avec le tampon de couplage à 3 reprises, avec de l'eau froide à trois reprises et avec un tampon d'entreposage (20mM phosphate pH 6,5, 1mM DTT, 0,5mM EDTA, 10% glycérol) encore à trois reprises. Les billes sont gardées dans le tampon d'entreposage selon un rapport 1:1 billes/tampon avec 0,02% NaN₃, sous azote à 4°C.

2.2.3. PREPARATION DU SUBSTRAT

Le substrat utilisé lors de la vérification de l'activité de la protéase insolubilisée est le virus Ad2-ts1 marqué avec la méthionine-³⁵S. La préparation de ce substrat est expliquée dans l'article de Weber (1976).

2.2.4. TEST D'ACTIVITE DE LA PROTEASE LIEE A LA BILLE

Les billes de protéase liée sont lavées à trois reprises avec un tampon PBS (20mM phosphate pH 6,5, 1mM DTT, 0,5mM EDTA, 150mM NaCl). Le dernier lavage se fait avec le même volume que l'échantillon de billes à être vérifié, afin d'être constant dans la comparaison de l'activité. Les billes contenant la protéase et le dernier lavage sont mis en contact avec le substrat Ad2-ts1 sous azote en rotation à 37°C pendant 16h. Le produit de la réaction est séparé sur gel PAGE-SDS 12,5% dans un tampon d'électrophorèse (400ml tampon 10X, 40ml SDS 10% dans un volume final de 4l; tampon 10X: 24g Tris, 115,2g glycine dans 4l d'eau) à 60V. Le gel est séché et exposé à un film Cronex 4 pendant la nuit afin d'obtenir un autoradiogramme du profil du virus Ad2-ts1 marqué à la ³⁵S-méthionine.

2.3. CRIBLAGE DE LA PEPTOTHEQUE DE PHAGES

2.3.1. CRIBLAGE DE LA PEPTOTHEQUE CONTRE LA PROTEASE ADENOVIRALE

Un volume de 5ul de la peptothèque de phages amplifiée est mis en contact avec 20ul de billes contenant de la protéase active en présence de 100ul de TBS sous azote en rotation à 4°C pendant 16 h. Les billes sont lavées en rotation pendant 15 min avec 1ml de TBS/BSA 1mg/ml et ensuite 10 fois avec 1ml de TBS/Tween 20 0,5% (v/v) en rotation pendant 5 min en éliminant le surnageant. Un volume de 500ul d'un tampon citrate 0,05M pH 6,0 est utilisé afin de dégager les phages, en rotation pendant 5 min toujours à 4°C. Cette étape est répétée deux fois afin d'obtenir un éluat de phages d'un volume final de

1ml. Cette procédure est répétée avec un gradient de pH de 6,0, 5,0, 4,0 et 3,0. Les éluats sont neutralisés avec une solution de Tris-HCl 1M pH 8,7.

2.3.2. TITRE DES ELUATS ET DE LA PEPTOTHEQUE UTILISEE

Une culture de 4 h des bactéries K91 est utilisée afin de titrer les phages. Un volume de 100ul de la culture bactérienne K91 est mélangé avec 100ul de l'échantillon, soit les éluats obtenus ou bien un échantillon de la peptothèque utilisée diluée à 10^{-6} dans du TBS/gélatine 0,1% (p/v). Ce mélange est incubé pendant 5 min à la température de la pièce. La Tc est ajoutée à 0,2 ug/ml avec 1ml du milieu 2xYT et le tout est incubé à 37°C avec agitation pendant 15 min. Ces cultures sont diluées dans du TBS/gélatine 0,1% à 10^{-1} et 10^{-2} . Cette culture et les dilutions sont inoculées à un volume de 20ul sur un pétri de 2xYT, 1,5% agar, 40ug/ml de Tc, séché auparavant pendant 48 h à 37°C afin que la solution pénètre bien dans le pétri. Il est possible d'inoculer 6 échantillons avec ses deux dilutions sur un seul pétri. Les pétris inoculés sont incubés pendant 16 h à 37°C. Les unités de transduction (TU) sont obtenues par une résistance à la Tc, présente dans le phage, qui est transférée à la bactérie infectée. Un TU apparaît sous la forme d'une colonie sur le pétri qui contient la Tc. Le nombre de colonies est multiplié par le facteur de dilution utilisé afin d'obtenir une valeur de TU/ml qui est ensuite ramenée à la valeur de TU.

2.3.3. AMPLIFICATION DE L'ELUAT DE pH 3,0

L'éluat de pH 3,0 est concentré à un volume de 100uL à l'aide d'un centricon 10kD en centrifugeant à 3 500 rpm à l'aide du rotor Sorvall HG-4 à 4°C environ 30 min. La solution concentrée est ensuite transférée dans un tube Falcon de 40ml avec 100ul d'une culture fraîche de 4 h des bactéries K91. Ce mélange est incubé pendant 10 min à 37°C sans

agitation. Un volume de 5ml de milieu 2xYT contenant 0,2ug/ml de Tc est ajouté à la culture et incubé pendant 45 min à 37°C avec agitation. Un volume de 20ml de 2xYT avec 40ug/ml de Tc est ajouté et incubé pendant 16 h à 37°C avec agitation.

La culture est ensuite centrifugée à l'aide du rotor HG-4 à 3 500 rpm à 4°C pendant 30 min. Le surnageant est transféré dans un tube Oakridge et centrifugé à 10 krpm à 4°C pendant 10 min à l'aide du rotor Sorvall SS34. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube Oakridge. Le tout est incubé à 70°C pendant 30 min après lequel le tube est centrifugé à 10 krpm pendant 10 min à 4°C à l'aide du rotor SS34. Le surnageant est transféré dans un tube Oakridge prépesé et le poids net du volume du surnageant est calculé. Le PEG/NaCl est ajouté au surnageant à 15% du poids net, le tube est inversé environ 100 fois, et incubé pendant 4 h sur de la glace.

Le mélange est ensuite centrifugé à 17 krpm pendant 20 min à 4°C à l'aide du rotor SS34. Le culot, à peine visible, est dissout dans 1ml de TBS qui est ensuite transféré dans un tube Eppendorf de 1,5ml. Le tube est centrifugé brièvement, le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 150ul de PEG/NaCl sont ajoutés, inversé encore 100 fois et puis incubé pendant 1h sur la glace. La solution est centrifugée à 12 krpm à 4°C pendant 15 min, le culot est dissout dans un volume de 100ul de TBS/NaN₃ 0,02% et gardé à 4°C. Cette préparation est utilisée pour la prochaine ronde de criblage avec la protéase Ad2 insolubilisée.

2.4. IDENTIFICATION DES PEPTIDES SELECTIONNES

2.4.1. ISOLEMENT DES PHAGES

Un échantillon de 100ul de l'éluat à pH 3,0 de la quatrième ronde est mélangé avec une culture fraîche de bactéries K91. Ce mélange est incubé pendant 5 min à la température

ambiante. On ajoute 1 ml de milieu 2xYT contenant 0,2 ug/ml et on incube pendant 15 min à 37°C avec agitation. On inocule 200uL du produit sur un pétri de 2xYT, 1,5% agar, 40ug/ml Tc séché qu'on incube pendant 16 h à 37°C. Les colonies isolées infectées par un phage sont repiquées individuellement et placées dans un volume de 1ml de 2xYT. De même, une culture de bactéries K91 incubée pendant 16 h est diluée, 10ul dans 1ml de milieu 2xYT. Ces cultures sont incubées pendant 2 h à 37°C avec agitation. Les deux cultures, K91 et la colonie infectée par le phage, sont mélangées ensemble dans un tube Falcon de 40ml auquel on ajoute un volume de 5ml de milieu 2xYT contenant 40ug/ml Tc, et on incube à nouveau pendant 5 h à 37°C avec agitation. Un volume de 100ul de cette culture est ensuite diluée dans 10ml de 2xYT, 40ug/ml Tc et incubée pendant 20 h à 37°C avec agitation. Ces cultures sont centrifugées à 3 500 rpm pendant 30 min à 4°C à l'aide du rotor HG-4. Le surnageant contenant les particules de phages est transféré dans un tube et la culture du phage isolé est gardée dans ce milieu à 4°C.

2.4.2. EXTRACTION DE L'ADN SIMPLE BRIN

L'ADN simple brin du phage filamenteux sélectionné est extrait d'une culture de 10ml préparée comme expliqué ci-haut, selon le protocole du système de purification Sephaglas pour phages ("Sephaglas PhagePrep") de Pharmacia. L'ADN obtenu est prêt à être séquencé.

2.4.3. SEQUENCAGE DE L'ADN SIMPLE BRIN

L'ADN simple brin des phages a été séquencé à partir du système de séquençage de Pharmacia utilisant la polymérase T7 ("T7 Sequencing Kit") avec l'amorce 5' HO-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-OH 3' qui a été généreusement donné par G.P. Smith.

La dATP-³⁵S utilisée provient de Amersham. Les réactions sont analysées sur un gel d'acrylamide de 6% dans un tampon TBE (50mM Tris-HCl pH 8,0, 50mM acide borique et 1mM EDTA), à un courant électrique de 22mA. Après électrophorèse, l'urée contenue dans le gel est enlevée en le trempant dans un bain de 10% méthanol et 10% acide acétique pendant 45 min à la température de la pièce. Le gel est ensuite séché sur la plaque de verre à l'aide d'un séchoir et exposé à un film Kodak XRP-1 pour la nuit à la température ambiante.

2.5. RECHERCHE AVEC LE LOGICIEL BLAST

Le logiciel Blast a été utilisé afin de révéler des homologies entre les peptides identifiés par le criblage de la peptothèque contre la protéase adénovirale. La fonction blastp a permis de faire une recherche dans la banque de données de Swissprot. Cette fonction retrouve l'homologie entre la séquence d'acides aminés du peptide avec les séquences d'acides aminés des protéines contenues dans la banque de données.

La fonction tblastn a été utilisée afin de faire une recherche dans la banque de données de Genbank afin d'isoler les homologies entre la séquence des acides aminés du peptide avec les séquences d'ADN sur les deux brins ainsi que dans les 6 cadres de lecture possibles. Le résultat montre la séquence d'acides aminés, tout en indiquant le brin et la cadre de lecture sur lequel l'homologie a été retrouvée.

3. RESULTATS

3.1. ACTIVITE DE LA PROTEASE ADENOVIRALE TYPE 2 LIE SUR LA BILLE

Une fois que la protéase adénovirale recombinante purifiée est liée sur les billes de Réacti-Gel 6X (Pierce, Rockford, Illinois), l'activité enzymatique est vérifiée afin de déterminer si la protéase est indemne. L'activité enzymatique est mise en évidence par un changement de la masse moléculaire de la protéine pVII du virus Ad2-ts1 purifié, marqué à la méthionine ^{35}S , qui est coupée pour donner la protéine VII. Ce résultat est illustré à la figure 4, piste B, où l'on voit disparaître la protéine pVII du virus Ad2-ts1 pour voir apparaître la protéine VII. Les résultats montrent que la protéase insolubilisée est active. L'activité de la protéase n'est pas maximale, on estime que seulement 50% du substrat présent est coupé. Ce résultat peut être expliqué par une trop grande concentration de substrat par rapport à la quantité d'enzyme, celle-ci n'est pas capable de réagir avec le substrat en excès. De plus, il est possible que la présence de la bille peut être un peu néfaste à l'activité de la protéase.

3.2. CRIBLAGE DE LA PEPTOTHEQUE A LA PROTEASE ADENOVIRALE

3.2.1. RENDEMENT DU CRIBLAGE

Lors de ces essais, la peptothèque ayant une complexité de 10^8 séquences peptidiques différents possibles retrouvés parmi les 10^{12} phages. Chacun des phages représentent une séquence peptidique qui se retrouve à raison de 1000 copies. Une première amplification de la peptothèque, à partir du stock obtenu des laboratoires Merck, permet à 10^9 phages d'être amplifiés au nombre de 10^{10} assurant l'expression des 10^8

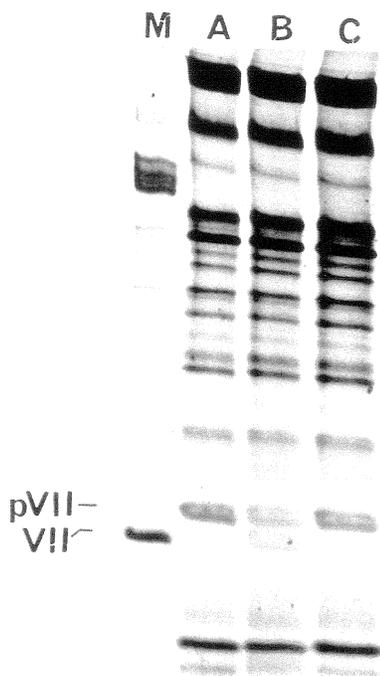


FIGURE 4-Test d'activité de la protéase insolubilisée.

Les réactions enzymatiques sont migrées sur un gel PAGE-SDS 12,5% afin d'étudier le profil protéique du virus. La piste M démontre le profil protéique du virus de type sauvage marqué à la ^{35}S -méthionine avec ses protéines matures, qui est utilisé comme le marqueur. La piste A nous laisse voir le profil du virion Ad2-ts1 marqué au ^{35}S -methionine qui est utilisé comme substrat. La piste B démontre le profil du substrat Ad2-ts1 en présence des billes contenant la protéase Ad2 et la piste C, le substrat Ad2-ts1 en présence du surnageant du dernier lavage des billes. L'activité de la protéase adénovirale est visualisée par la disparition partielle de la protéine pVII et l'apparition de la protéine VII.

séquences différentes retrouvées dans la peptothèque, dont chacun est représenté à raison de 100 copies.

Le criblage de la peptothèque s'est fait à partir de 10^8 phages qui ont été mis en contact avec la protéase adénovirale liée où chaque essai de criblage est noté comme étant une ronde de sélection. Chaque ronde de sélection consiste à mettre le phage en contact avec la protéase fixée, des lavages afin d'éliminer les phages non spécifiques et puis une série d'élutions avec un gradient de pH de 6,0 à 3,0. Chacune de ces éluions est titrée afin d'obtenir le pourcentage de rendement qui est calculé à partir des titres obtenus en unités de transduction (TU). Ce pourcentage est calculé à partir du titre de l'éluat obtenu, divisé par la quantité de phage qui a été mise en contact avec la protéase, ce quotient est ensuite multiplié par cent. L'éluat obtenu a pH 3,0 est amplifié et remis en contact avec la protéase fixée pour une deuxième ronde.

Le pourcentage de rendement est calculé pour tous les éluats aux différents pH ainsi qu'à chaque ronde de sélection. Le nombre de rondes effectuées est déterminé par ces pourcentages de rendement. En présence d'une augmentation du rendement au pH sélectif, le pH 3,0 dans ce cas, la procédure de sélection est terminée. Cette augmentation du rendement indique un plus grand nombre de phages qui ont lié la protéase après l'amplification des candidats de la ronde précédente. Une amplification des phages sélectionnés après la quatrième ronde, dans notre cas, aurait pu saturer notre cible, la protéase, et nous aurions perdu la diversité de la peptothèque. En d'autres mots, il y aurait eu trop de phages avec les mêmes séquences qui auraient lié la protéase et empêché les autres de se lier, même si leur affinité pour la protéase est comparable. Une quantité limitée de protéase et les limites physiques entre les phages eux-mêmes peuvent finir par éliminer certains phages sélectionnés qui ont été obtenus.

La figure 5, illustre les pourcentages de rendement des quatre rondes aux différents pH. Puisque la sélection des phages se fait à pH 3,0, on remarque que les éluats aux autres pH après une sélection sont moindres par rapport au rendement obtenu au pH de sélection. Cet effet indique que la majorité des phages qui sont sélectionnés et amplifiés aux deux premières rondes, si l'on étudie les résultats de la troisième ronde, sont des ligands qui fixent mieux et donc résistent à la dissociation des liens ioniques par les pH supérieurs à pH 3,0. Les trois premières rondes montrent une légère diminution du rendement, démontrant une sélection de plus en plus rigoureuse. Le rendement plus grand à la quatrième ronde indique une sélection spécifique où l'on retrouve un plus grand nombre des phages sélectionnés qu'à la ronde précédente. Lors des amplifications, les phages qui présentent une séquence qui lie sont amplifiés. Une deuxième sélection favorise la liaison d'un plus grand nombre de ligands plus forts tout en éliminant les candidats qui ont moins d'affinité pour la protéase.

Un grand pourcentage de rendement indique que la majorité des phages qui ont été sélectionnés ont lié la protéase spécifiquement. Cette augmentation du rendement au pH de sélection est illustrée à la figure 6. On peut y voir une démarcation nette du rendement obtenu après quatre rondes de sélection. Les pourcentages de rendement présentés proviennent de l'une des deux essais de la même expérience. À deux reprises, on remarque le même profil, une augmentation du pourcentage de rendement des phages retrouvés dans l'éluat à pH 3,0 à la quatrième ronde. L'éluat à pH 3,0 de la quatrième ronde est ensuite utilisé afin d'isoler les phages sélectionnés par la protéase de la peptothèque de phages.

3.2.2. PEPTIDES SELECTIONNES LORS DU CRIBLAGE

À partir de cette peptothèque, il a été possible d'isoler 29 peptides différents à partir de 63 phages sélectionnés. Le tableau 2 présente ces séquences ainsi que leur fréquence

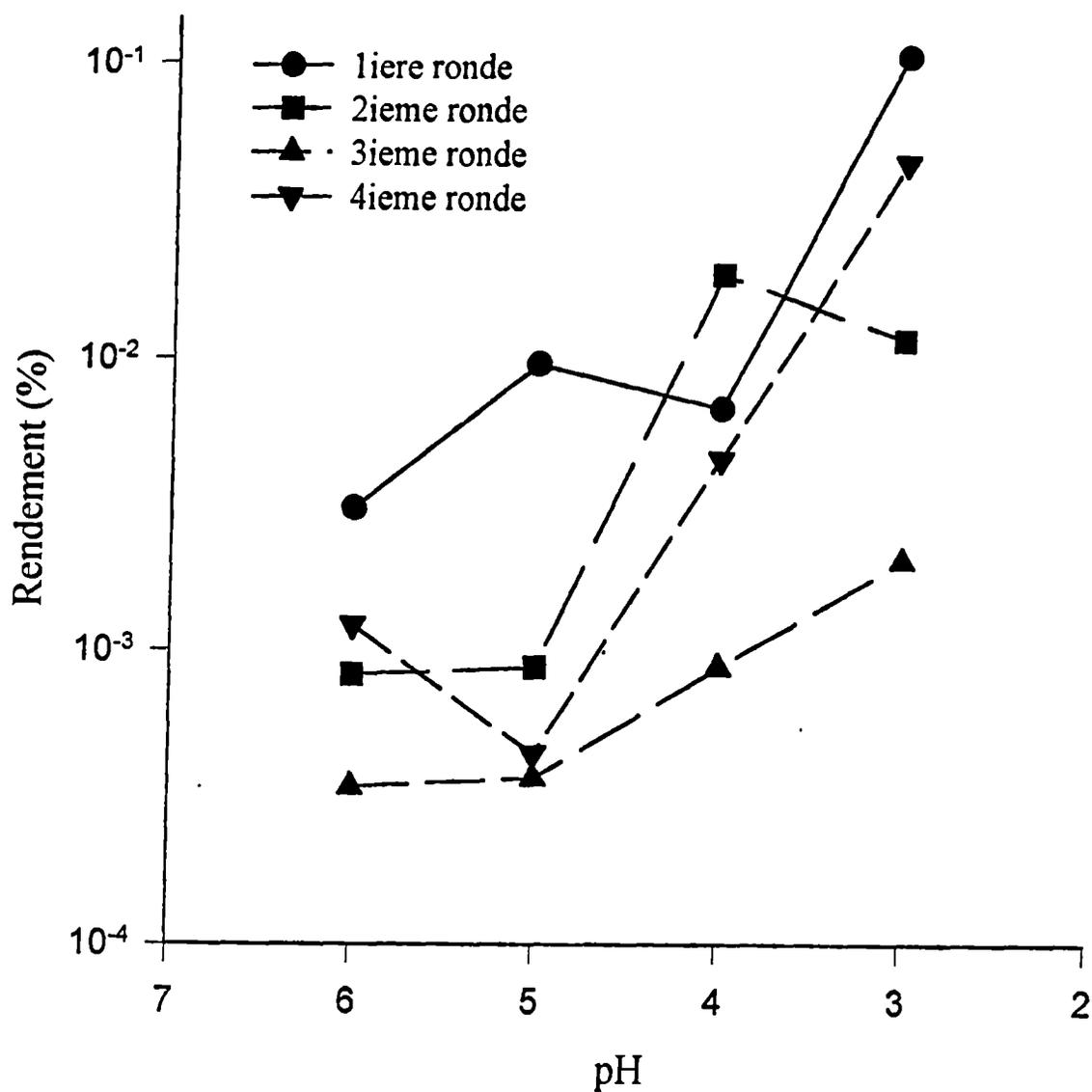


FIGURE 5-Pourcentage de rendement aux différents éluats de pH de chaque ronde de sélection.

Le pourcentage de rendement est calculé à partir du titre obtenu lors des éluations par les différents pH. Ce pourcentage est calculé à partir du nombre de phages qui ont été mis en contact avec la protéase au départ en unités de transduction (TU) divisé par le titre (TU) obtenu dans les éluats, multiplié par 100. L'ordonnée est en échelle logarithmique.

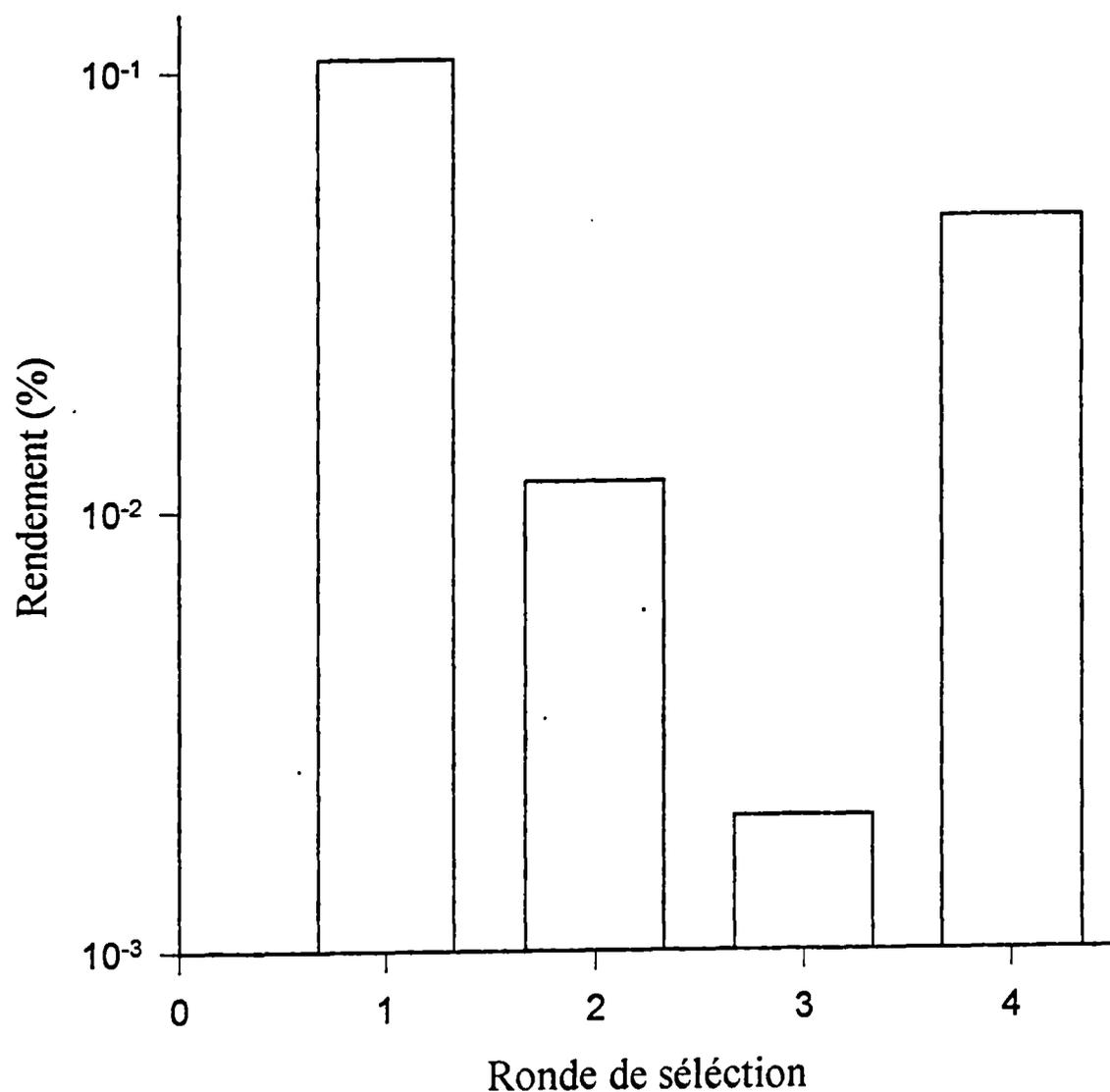


FIGURE 6-Pourcentage de rendement des éluats au pH 3.0 (pH de sélection) aux quatre rondes de sélection.

Ce pourcentage est calculé à partir du nombre de phages qui ont été mis en contact avec la protéase au départ en unités de transduction (TU) divisé par le titre (TU) obtenu dans les éluats, multiplié par 100. L'histogramme est représenté sur une échelle semi-logarithmique.

	<u>Séquence</u>	<u>Clone</u>	<u>Fréquence</u>
1.	WGKVEGGSVGHYLSA	CCP1a-14	22
2.	WGKEEGGSVGHYLSA	CCP1a-9	1
3.	WGKVEGGSVGHYMSA	CCP1a-10	2
4.	WGKVEGGSVGHDLSA	CCP1a-2	2
5.	WGKVEGGSVGEDLSA	CCP1a-7	1
6.	WGKVEGGSVGQGMSA	CCP1-19	1
7.	WGKVEGGSVGODLSA	CCP1a-11	1
8.	CRNVQGGSVGHYLSA	CCP1a-19	1
9.	WGKVEGGSVGLYLSA	CCP1a-8	1
10.	WGKGFERSVGY<u>YLSG</u>	CCP1a-13	1
11.	VRRFIKADIKQAVY	CCP1a-21	1
12.	KMRGFGAGQSELNAP	CCP1a-29	1
13.	GPVSQVFGVLVGRNG	CCP1-23	7
14.	FGRP<u>KLLIKALGSEL</u>	CCP1-29	3
15.	DGELTSLLGLFGAVG	CCP1-28	1
16.	SENSSGVKSGKMLWV	CCP1a-23	1
17.	GISGLLSAWYGTSEM	CCP1a-24	1
18.	SAEGLLLASWLVNSV	CCP1a-25	1
19.	WRSVTSLASN<u>ILGGT</u>	CCP1a-26	1
20.	RPAEWIAGL<u>GLLGGN</u>	CCP1a-22	1
21.	RDPLGLGGGDRGTLG	CCP1-24	1
22.	SGVLGVVRCARIG	CCP1a-27	1
23.	DAFLGGLDRFSSGGR	CCP1-26	1
24.	ASVLD<u>SIGLMRGILG</u>	CCP1a-G	1
25.	YAQGLGVVFGIMQRG	CCP1a-F	1
26.	DVLKQRE<u>RGLGWGPD</u>	CCP1a-C	1
27.	DMGVGNV<u>RMHAEIGT</u>	CCP1a-D	1
28.	RHGLAANLVEDL<u>TTR</u>	CCP1a-E	1
29.	HREFMWNVAEGETAV	CCP1a-I	1

TABLEAU 2-Séquences des peptides des phages isolés à partir du criblage de la peptothèque de phages contre la protéase recombinante adénovirale de type 2.

Les acides aminés sont représentés par les symboles à une lettre. Un tableau avec la correspondance de ces symboles à l'acide aminé se retrouve en annexe 1. La fréquence indique le nombre de fois que la séquence est apparue parmi les 63 phages séquencés, ceux-ci possèdent tous la même séquence d'acide nucléique. Les séquences soulignées sont des séquences des sites de clivage connus de la protéase adénovirale, (M,I,L)XGG^X ou (M,I,L)XGX^G, pouvant aller de gauche à droite et vice versa. Les séquences en caractères gras indiquent une grande homologie entre les peptides. La séquence en italique du peptide 16 est semblable à la séquence du pVIct. La séquence de part et d'autre de la région aléatoire est DGAC(X₁₅)CGAA.

d'apparition parmi ces 63 phages séquencés. La fréquence représente le nombre de fois que le phage a été sélectionné dans les 63 phages séquencés. Le peptide 1. WGKVEGGSVGHYLSA est retrouvé à 22 reprises mais il est à noter que la séquence de l'acide nucléique est identique chez ces 22 phages, donc le même phage a été retrouvé à plusieurs reprises sur différents pétris. Ce résultat peut être expliqué par une grande affinité de ce phage pour la protéase qui a été amplifié à chaque reprise, donc un très bon ligand. Il faut aussi tenir compte du fait que ce phage peut être plus efficace pour une raison inconnue lors de l'infection de la bactérie, et encore une fois ceci le rend plus facile à être amplifié augmentant la probabilité d'être sélectionné. Puisque la peptothèque contient 10^8 peptides différents en théorie et que cela n'a pas été vérifié dans notre laboratoire, il est possible que ce phage soit surreprésenté dans la peptothèque, soit par un biais dans le PCR dégénéré, ou bien encore lors de l'amplification de la peptothèque.

En examinant de plus près les diverses séquences obtenues, il est possible d'identifier des séquences connues qui lient la protéase adénovirale. Les peptides 12, 19, 20 et 21 présentent tous un site de clivage connu (M,I,L)XGG[^]X ou bien (M,I,L)XGX[^]G. En tenant compte du fait que le côté droit de la séquence aléatoire possède la séquence CGAA, on retrouve des sites de clivage dans les peptides 10 et 24, à l'extrémité C-terminale du peptide. Puisque le peptide peut se lier de différentes manières à la protéase, on peut aussi regarder les séquences qui vont en sens inverse, c'est-à-dire qui sont lues de l'extrémité C-terminale vers l'extrémité N-terminale du peptide. On retrouve alors également des sites de clivage dans les peptides 20, 25, et 27.

De plus, le peptide C-terminal qui est dégagé de la protéine pVI (pVIct) de l'adénovirus est reconnu comme étant un stimulant de l'activité de la protéase et donc un ligand. Le tableau 3 présente les séquences retrouvées du peptide pVIct chez les différents types d'adénovirus. Une comparaison des données de ce tableau avec la séquence du

**SEQUENCES OF PROTEINASE-ACTIVATING
PEPTIDES (PVI-C)**

Virus	Peptide
H2	GVQSLKRRRCF
H5	GVQSLKRRRCF
H12	GVKSLKRRRCY
H41	GVKSLKRRRCY
Mav1	GLQPIKRRRCF ^a

^a J. M. Weber, F. Cai, R. Murali, and R. M. Burnett,
J. Gen. Virol. **75**, 141 (1994).

**TABLEAU 3-Tableau des séquences du produit pVIct chez les différents types
d'adénovirus.**

(Tiré de Weber et Tihanyi, 1994)

peptide 16 du tableau 2: GVKSGKMLWVC, nous laisse voir une homologie avec le peptide pVIct: GVKSLKRRRCY de Ad12 et Ad41.

La présence de ces séquences connues qui ont été sélectionnées suggère que les clones identifiés sont spécifiques pour la protéase. En étudiant de plus près, 32 des phages sélectionnés ont une homologie assez grande: à partir du peptide 1 à 9, la séquence WGKVEGGSVG...SA est conservée pour la majorité. Une séquence semblable au site de clivage connu est conservée assez fidèlement, soit la séquence VEGGS où la valine est homologue avec la I, et L, mais ce site n'est pas connu comme étant un site de clivage (Weber, 1995).

3.3. ETUDE DES PEPTIDES IDENTIFIES A PARTIR DES BANQUES DE DONNEES

3.3.1. BANQUE DE DONNEES SWISSPROT

Une recherche d'homologie entre les peptides sélectionnés lors du criblage avec une banque de données de séquences protéiques, Swissprot, nous permet d'étudier des protéines de séquences homologues. Le tableau 4 compile les peptides et les protéines qui ont été triées à l'aide de la fonction blastp du logiciel Blast, qui cherche des homologies entre les peptides exprimés sur les phages sélectionnés et les protéines de la banque de données Swissprot. Ces protéines présentent des homologies d'au moins 50% afin d'être sélectionnées, seulement les plus homologues ont été présentées dans ce tableau et en annexe 2. Certaines protéines de l'adénovirus ont été sélectionnées à partir de cette recherche.

Le peptide 12, qui correspond au même peptide 12 du tableau 2, a ressorti une région homologue avec la protéine pTP de Ad2 et Ad5. Le peptide a été coupé en trois régions différentes sur la protéine. La première section démontrée dans le tableau,

<u>Peptide*</u>	<u>Protéine</u>	<u>Code</u>	<u>Régions homologues**</u>
1.	Hémoglobine	P18991	WGK <u>VEGG</u> SVG <u>QDL</u> SA
1.	Myoglobine	P04248	WGK <u>VEGG</u> SVG <u>Q</u> G
1.	Ferredoxin	P07838	GK <u>VEGG</u> SVG <u>Q</u>
1.	Polymérase ARN	P19751	GG <u>SVGH</u> Y
8.	Kératine (souris)	P05784	RNV <u>OGGS</u> SVG
10.	Précurseur endoglucanase B	P18126	WGK <u>GFERS</u> V
11.	Anthranilate synthase	P30526	VRR <u>FIAKAD</u> IKQAV
12.	Protéine terminale Ad2 (et Ad5)	P03269	MRG <u>FG/AGQSE/LN</u> APC
13.	Protéine précurseur récepteur TNF	P25943	<u>VLVGR</u> <u>NGC/CGPVS</u>
14.	Mos proto-oncogène S/T protein kinase	P12965	CFGR <u>PKLL/LGSEL</u> C
15.	Endonucléase FLAP-1	P39749	<u>DGELT</u> <u>SL</u> <u>LG</u> LF
16.	ARN polymérase (maïs)	P09562	NSSG <u>VKSG</u> KMLW
17.	Synthase de citrate (E. coli)	P00891	CGIS<u>GLLSAW</u>YGTS
18.	Mucin 2	Q02817	CSA<u>EGL</u><u>LLAS</u>W
19.	Précurseur AGRIN (rat)	P25304	VTSL<u>ASNI/GGTC/CWR</u>
20.	Endonucléase I-SCEII (levure)	P03878	<u>EWI</u> <u>AGL/LL</u> GGN
21.	Protéine 100K (Ad2)	P24932	RDPL<u>GLGGGDR</u>GTLG
22.	Protéine récepteur acétylcholine neuronal	P12390	CSG <u>VLG/RCAR</u>
24.	Polyprotéine "retrovirus-related"	P16423	SIG<u>L</u>MRG<u>IL</u>GC
25.	Récepteur ERBB-2	P04626	LG <u>VVFG</u> IM
26.	Phosphorylase glycogène	P39123	DVL<u>KQRE/GPDC</u>
27.	Cyclohydrolase GTP II	P38066	DM<u>GVGN</u>VRM
28.	Exonucléase alcaline	P30660	RHGLAA
29.	Précurseur hémopexin	P02790	REF<u>MWN</u><u>VAEG</u>

TABLEAU 4-Homologies retrouvées entre les peptides des phages sélectionnés pour la protéase adénovirale et les séquences protéiques obtenues à partir de la banque de données Swissprot. et la fonction blastp du logiciel Blast.

La séquence du peptide provenant du phage sélectionné est présentée dans ce tableau. Les lettres en **caractère gras** représentent une **identité** entre la séquence du peptide avec la protéine en question, les lettres soulignées représentent une homologie entre les deux séquences et les lettres ordinaires ne représentent aucune homologie. Le code qui apparaît est le code de la banque de données Swissprot. Les informations et les alignements obtenus par le logiciel Blast sont retrouvés en annexe 2.

*-chiffre du peptide correspond au peptide du phage sélectionné du tableau 2.

**-"/" indique que le peptide a été divisé lors de la recherche afin de trouver des homologies à différentes régions de la protéine.

MRGFG, est le site de clivage authentique de cette protéine (Webster *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 1989a). Les deux autres régions du peptide s'associent avec des régions un peu éloignées du site de clivage, 25 et 105 a.a. plus loin respectivement. Ces sections de la protéine sont éloignées l'une de l'autre en terme de la séquence d'acides aminés mais si on tient compte de la structure tridimensionnelle de la protéine pTP, qui n'est pas encore connue, il est possible de s'imaginer que ces trois régions sont en effet l'une à côté de l'autre dans la protéine repliée.

La séquence du peptide 21 est aussi homologue avec une protéine de l'Ad2, la protéine 100kD. La séquence de ce peptide est homologue avec une série de protéines riches en glycine dû au grand nombre de résidus glycine retrouvés dans la séquence du peptide. De même, la protéine Ad2 100kD possède une région riche en glycine dans la région C-terminale. Un alignement des séquences de la protéine 100kD des différents types d'adénovirus permet de voir que cette région est conservée chez les divers types (figure 7). De plus, une comparaison avec la séquence du peptide obtenu montre une homologie avec les protéines des autres types d'adénovirus même si elles n'ont pas été mises en évidence par la recherche avec le logiciel Blast.

Les autres protéines qui ont été dévoilées ne proviennent pas de l'Ad mais en reliant leur fonction chez les autres organismes, ainsi que les motifs fonctionnels qui peuvent en dériver, il est possible de pouvoir mieux comprendre le mécanisme d'action utilisé par la protéase.

3.3.2. BANQUE DE DONNEES GENBANK

À l'aide de la banque de données Genbank, il a été possible de vérifier les homologies entre les séquences d'ADN transcrites en acides aminés à partir de la fonction

c121	R	D	P	L	G	L	G	G	G	D	.	R	G	T	L	G
L100_Ade02	R	G	G	F	G	R	G	G	G	D	.	D	G	R	L	G
L100_Ade05	R	G	G	F	G	R	G	G	G	G	H	D	G	R	L	G
L100_Ade40	R	G	S	F	R	R	G	G	G	G	A	D	G	E	L	G
L100_Ade41	R	G	S	F	R	R	G	G	.	.	.	N	G	E	L	G
L100_Ade12	R	G	L	G	R	M	G	G	G	G	G	G
L100_Adegx	A	G	N	R	T	R	G	C	S	S	A	R	Y	R	L	G

FIGURE 7-Alignement des séquences de la protéine 100kD des différents types d'adénovirus en comparaison avec la séquence du peptide 21 (c121) provenant du phage sélectionné de la peptothèque.

L'identité entre le peptide sélectionné et les séquences de la protéine 100kD est encadrée. L'alignement des différentes séquences de la protéine 100kD a été accompli à l'aide du logiciel Pileup de GCG (Genetics Computer Group) de l'Université de Wisconsin. La première ligne c121 correspond à la séquence 21 des tableaux précédents, Adegx est un adénovirus du poulet, et les autres adénovirus présentés sont divers types humains.

tblastn du logiciel Blast. Cette recherche nous permet de vérifier les homologies des deux brins des séquences d'ADN dans la banque de données ainsi que dans les 6 cadrans de lecture possibles. Les résultats de cette recherche sont présentés dans le tableau 5, où l'on remarque qu'il n'y a pas de protéines de l'adénovirus qui ont été isolées.

<u>Peptide*</u>	<u>Protéine</u>	<u>Code</u>	<u>Brin</u>	<u>Régions homologues**</u>
1.	Clone ADNc IB897B humain ressemble pyruvate kinase M2	T03784	+	WGK <u>Y</u> EGG/VGHYLSA
10.	Ser-ARN de transfert humain	M27316	+	<u>E</u> RSVG <u>Y</u> YLSG/WGKG
13.	ADN RecG de <i>E.coli</i> .	X59550	-	CGPVS <u>Q</u> VFGVLYG
14.	Clone ADNc clone 27604 5'	R13957	-	FGR <u>P</u> KLLIKALGSELC
15.	Gène humain de la catalase	X04087	-	LGLFGAVGC/CDGELTS
16.	Cytochrome P-450 Humain	M21940	-	KSG <u>K</u> MLWVC/ <u>E</u> NSSGV K
17.	Virus de l'érythroblastose Avian	K01216	-	CGISGLLSAW/AWY <u>G</u> TS EM
18.	Clone tb048 humain ADNc HepG2 3'-dirigé MboI .	D12363	+	ASWL <u>V</u> NSVC
19.	Gène humain hydroxyindole O-méthyltransférase (HIOMT), exon 8.	U11097	+	CWRSVTSLSAN <u>L</u> GGTC
20.	Clone ADNc <i>Homo sapiens</i> 71487 3'	T51506	+	CRPAEWI/LLGG <u>N</u> C
22.	ARNm déoxyribonucléase I du rat	X56060	+	SG <u>V</u> LG <u>V</u> VRC
23.	ARNm du c-erbA-1 humain pour le récepteur alpha de l'hormone de la thyroïde .	X55005	+	<u>A</u> FLGGLDRFSS/ <u>S</u> GGRC
24.	ARNm de la kératine acide type-1 de la souris	M27734	-	CASVLDS <u>I</u> GL
25.	ARNm de Bos taurus neurexin I-alpha	L14855	+	<u>V</u> FGIMQRGC/CYA <u>Q</u> GLG V
26.	ARNm O-6-méthylguanine-ADN méthyltransférase de la souris	M84524	-	RGLGWGPDC
27.	Virus Herpes simplex type 1 région longue unique (UL)	D10879	-	CDMGVGNVRMHAE <u>I</u> GT C
28.	Bactériophage mv4 gènes lysA et lysB	Z26590	-	ANL <u>V</u> EDLT <u>T</u> RC/CRHGL AA
29.	<i>S.cerevisiae</i> gènes RIM, MSI1, PGI, et protéine ribosomale L21	Z21487	+	CHREFMWN <u>V</u> AE

TABLEAU 5-Homologies retrouvées entre les peptides des phages sélectionnés pour la protéase adénovirale et les séquences protéiques obtenues à partir de la banque de données Genbank, et la fonction tblastn du logiciel Blast.

La séquence présentée dans ce tableau est la séquence du peptide du phage sélectionné. Les lettres en caractère gras représentent une identité entre la séquence du peptide et la protéine correspondante, les lettres soulignées représentent une homologie entre les deux séquences et les lettres ordinaires ne représentent aucune homologie. Le code qui apparaît est le code de la banque de données Genbank. La région de l'homologie peut être avec le brin "+" ou "-" de l'ADN. Les informations et les alignements obtenus par le logiciel Blast sont retrouvés en annexe 2.

*-chiffre du peptide correspond au peptide du tableau 2.

**-"/" indique que le peptide a été divisé lors de la recherche afin de trouver des homologies à différentes régions de la protéine.

4. DISCUSSION

Les peptothèques de phages sont un outil de biologie moléculaire souvent utilisé au niveau de la découverte de nouveaux médicaments (Dower et Fodor, 1991). Les peptothèques sont utilisées afin d'isoler des ligands à une cible. Chez les virus, une protéase virale est souvent responsable de la maturation soit par le clivage d'une polyprotéine afin d'obtenir les diverses protéines virales nécessaires à la formation du virus comme chez le Picornavirus (Kräusslich et Wimmer, 1988; Lawson et Semler, 1990). L'adénovirus possède aussi une protéase qui permet la maturation des protéines précurseurs afin de rendre le virus infectieux. La protéase adénovirale est donc une bonne cible afin d'inhiber le cycle vital de l'adénovirus, et les informations qui peuvent provenir d'une étude à partir d'une peptothèque de phages peuvent nous informer au niveau du mécanisme d'activité de la protéase, le mécanisme retrouvé chez le virus ainsi que la possibilité de trouver un inhibiteur spécifique à la protéase.

Le groupe de Villar et Kauvar (1994) ont mis sur pied une étude d'un ensemble de protéines cristallisées. La cristallisation des protéines permet de connaître et étudier la structure tridimensionnelle ainsi que de voir l'interaction physique entre un ligand et une protéine. La fréquence des acides aminés qui se retrouvent dans les poches de liaison de ligands dans l'ensemble de ces protéines cristallisées met en évidence certains acides aminés spécifiques qui semble permettre la liaison entre ligands et protéines. Les acides aminés retrouvés le plus souvent lors d'une interaction protéine-ligand, en tenant compte de la fréquence relative sont le tryptophane, l'arginine, l'histidine et la tyrosine. Une comparaison avec la fréquence à laquelle nous trouvons ces acides aminés parmi nos peptides des phages sélectionnés démontre qu'il y a une plus grande fréquence observée dans notre échantillon par rapport à la fréquence moyenne d'apparition dans les protéines.

Le tryptophane et l'arginine dans notre échantillon, ce qui représente 50% (2/4) des acides aminés impliqués dans la liaison entre les ligands et les protéines, sont retrouvés à un plus grand taux que la moyenne (tableau 6). En étudiant la fréquence des autres acides aminés, seulement 31% (5/16) sont retrouvés à une plus grande fréquence que la moyenne.

La composition absolue des sites actifs des diverses protéines étudiées lors de cette même étude suggère que la glycine, la sérine, la tyrosine et l'arginine sont retrouvées le plus souvent. La comparaison avec nos peptides montre encore une fois une fréquence plus élevée pour la glycine, l'arginine et la sérine, un taux de 75% (3/4) d'homologie avec leurs résultats. Encore une fois en étudiant les autres acides aminés, seulement 25% (4/16) des autres acides aminés ont une fréquence plus élevée que la fréquence moyenne retrouvée parmi la série des protéines étudiées.

Il faut tenir compte que l'échantillon utilisé pour faire cette comparaison n'est pas très grand, seulement 29 peptides de 15 a.a. qui ont été isolés par rapport à 50 protéines complètes, mais il est tout de même intéressant de voir une plus grande fréquence des acides aminés impliqués dans la liaison entre les protéines et leur ligands en général, selon l'étude de Villar et Kauvar (1994), parmi nos séquences de peptides. Une fréquence au dessus de la moyenne des acides aminés impliqués dans la liaison entre protéines et ligands est sélectionnés par la protéase adénovirale. Ce qui suggère que la protéase présente une capacité de reconnaître certains sites de liaison et donc présente une capacité de lier autres protéines, soit virales ou cellulaires.

Les résultats obtenus par l'intermédiaire de la peptothèque utilisée nous fait voir certaines séquences connues tels les sites de clivage et une homologie avec le peptide pVIct (tableau 3). Une grande homologie existe avec une série des peptides possédant la séquence VEGGS. Cette séquence ressemble au site de clivage connu soit la présence des deux glycines, ainsi que la valine qui a une structure semblable à la leucine et l'isoleucine qui

<u>Acide aminé</u>	<u>Fréquence observée</u> (%)	<u>Fréquence moyenne</u> <u>d'apparition (%)</u>
A	7.2	8.3
C	0.5	2.0
D	3.2	5.8
E	5.5	5.5
F	2.3	3.9
G	21.5	8.1
H	1.8	2.1
I	2.5	5.6
K	3.9	5.6
L	10.6	8.3
M	2.3	2.0
N	2.3	4.2
P	1.4	4.5
Q	2.1	3.5
R	5.3	4.4
S	9.7	6.6
T	2.1	6.0
V	9.7	7.0
W	3.7	1.8
Y	2.3	4.0

TABLEAU 6-Comparaison de la composition en acides aminés des peptides des phages sélectionnés par la protéase avec les acides aminés qui sont retrouvés comme étant responsable de la liaison entre une série de protéines et leurs ligands correspondant selon Villar et Kauvar (1994)

La fréquence moyenne de l'apparition des acides aminés dans une protéine est tiré de Villar et Kauvar (1994), cette valeur a été calculée par ce groupe à partir des séquences et des cristaux de 50 protéines différentes connues. Cette étude a mis en évidence la présence de certains acides aminés qui sont impliqués lors de l'interaction entre une protéine en général et son ligand correspondant. La fréquence observée des acides aminés parmi les 29 séquences retrouvées lors de la sélection des phages est présentée dans la deuxième colonne. Les valeurs en caractère gras ont une fréquence plus élevée parmi les peptides sélectionnés en comparaison avec la fréquence moyenne des acides aminés.

font partie du site de clivage. La valine n'a tout de même jamais été retrouvée dans le site de clivage en position P4 (Weber, 1995). Ce peptide a été synthétisé afin de pouvoir étudier les effets sur la protéase ainsi que son influence sur l'infection virale.

Le peptide VEGGS a été choisi dû à l'homologie avec le site de clivage et sa petite taille qui peut assurer une plus grande facilité à pénétrer dans les cellules lors des essais *in vivo*, même s'il y a une assez grande région d'homologie autour de cette séquence. L'influence du peptide VEGGS sur l'activité de la protéase a été vérifiée à partir d'un substrat peptidique fluorescent et une protéase recombinante purifiée (Houde et Weber 1990; Diouri *et al.*, 1995). Les résultats préliminaires montrent une stimulation de l'activité de la protéase adénovirale *in vitro* (résultats non publiés). Cette stimulation est semblable à celle observée en présence du pVIct (Mangel *et al.*, 1993; Webster *et al.*, 1993). Il semble même y avoir une plus grande stimulation avec le peptide VEGGS.

Un essai *in vivo* où le peptide VEGGS est ajouté dans le milieu à la surface des cellules lors d'une infection avec le virus de type sauvage, montre le même profil qu'en présence du pVIct. Il y a une diminution du rendement de virus lorsque le peptide, VEGGS ou pVIct, est ajouté 7 heures après l'infection (résultats non publiés).

Le peptide pVIct, qui est d'une taille de 11 a.a., GVQSLKRRRCF, doit être sous forme de dimère par l'intermédiaire d'un pont disulfure entre les deux cystéines présentes afin d'agir sur la protéase (Webster *et al.*, 1993). Une stimulation par le peptide VEGGS qui est seulement d'une taille de 5 a.a. et qui ne possède aucune cystéine met en question le mécanisme proposé d'activation de la protéase par le pVIct. L'étude de la stimulation par le peptide VEGGS de la protéase adénovirale est en cours afin d'élucider et de mieux comprendre le mécanisme utilisé.

Les peptides sélectionnés ont été comparés aux banques de données Swissprot et Genbank en utilisant le logiciel Blast. Ces recherches ont mis en évidence certaines

homologies avec des protéines de l'adénovirus du type 2. Le candidat 21 du tableau 4 possède une homologie avec la protéine 100kD de l'adénovirus du type 2. En effet, la séquence de ce peptide est riche en résidus glycine et donc démontre une grande homologie entre plusieurs protéines avec une région riche en glycine dont l'une est la protéine 100kD. Cette région riche en glycine est responsable de la liaison à l'ARNm afin de stimuler la traduction des messages tardifs de l'adénovirus (Riley et Flint, 1993). La protéine 100kD est aussi responsable de la trimérisation des hexons lors de la formation des capsides, elle agit comme un échafaud et facilite l'entrée des hexons dans le noyau (Cepko et Sharp, 1982; Gambke et Deppert, 1983).

Le mutant Ad2-ts1 qui dispose d'une mutation dans le gène de la protéase, ne produit pas de virions à la température non-permissive de 39°C. Il a été démontré que la protéase était donc nécessaire à la maturation du virion et à la production de particules virales infectieuses (Weber, 1976). Une étude plus approfondie du mécanisme et de l'activité de ce virus mutant a mis en évidence que la protéase du mutant Ad2-ts1 est toujours active (Rancourt *et al.*, 1995) et que la thermosensibilité du virus se manifeste plutôt lors d'un problème dans le transport de la protéase jusqu'au virion pour assurer la maturation des protéines précurseurs des virions immatures. Il a été proposé par Rancourt et Weber (communication personnelle) que la protéase est associée avec une protéine, jusqu'à maintenant inconnue, qui, à cause de la mutation de la proline 137 en leucine du Ad2-ts1, ne peut plus être dégagée de cette protéine et ne peut donc pas rendre le virus mature. Dans l'article de Rancourt *et al.* (1995), le peptide pVIct est capable de libérer la protéase mutante, donc il est soupçonné que la protéine pVI libère la protéase du type sauvage de la protéine auquel elle est liée et la protéase procède alors à la maturation du virus. La mutation de la protéine empêche l'action de la protéine pVI et peut seulement être accomplie par le peptide.

La protéine 100kD qui lie et assure le transport des hexons au virion pourrait être la protéine à laquelle la protéase adénovirale se lie. La région riche en résidus glycine qui a été isolée par le criblage contre la protéase indique une attirance entre cette région et la protéase, suggérant que la protéase a une affinité pour cette région et peut s'y fixer. À partir de ces connaissances, il est donc possible de proposer que la protéase adénovirale est liée avec la protéine 100kD lors de la production des virions (figure 8). Cette hypothèse devra être étudiée afin de déterminer le processus de maturation de l'adénovirus.

Les recherches à partir des banques de données montrent aussi une homologie entre le peptide 12 et la protéine terminale (pTP), qui est liée à l'ADN chez l'adénovirus. La séquence de la région homologue (tableau 6 et annexe 2) est répartie sur trois régions différentes de la protéine pTP. La première région est le site de clivage authentique de cette protéine qui est un substrat de la protéase (Webster *et al.*, 1989a). La deuxième région s'étend sur cinq a.a. dont quatre a.a. sont identiques à 25 a.a. plus loin, la troisième région possède encore cinq a.a. dont 3 a.a. sont identiques et l'un est homologue avec une région à 80 a.a. plus loin encore. La structure tridimensionnelle de la protéine pTP n'est pas connue, mais il est possible que les régions homologues qui sont séparées dans l'ordre de la séquence d'acide aminé peuvent être replier, lors du repliement de la protéine, et se retrouver l'un à côté de l'autre à la surface externe de la protéine, correspondant à une suite à la surface de la protéine. Ces séquences sont peut-être reconnues comme étant un ligand pour attirer les protéines substrats afin de couper au site de clivage, mais les autres protéines substrats n'ont pas été relevées à partir de la recherche dans les banques de données. La protéase est capable de cliver certaines protéines non virales telles que l'ovalbumine et les cytokératines (Tihanyi *et al.*, 1993; Keyvani-Amineh *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1993), et il existe aussi certaines protéines qui ont un site de clivage qui n'est pas clivé (Webster *et al.*, 1989a; Weber et Tihanyi, 1994). Il se peut que la reconnaissance du

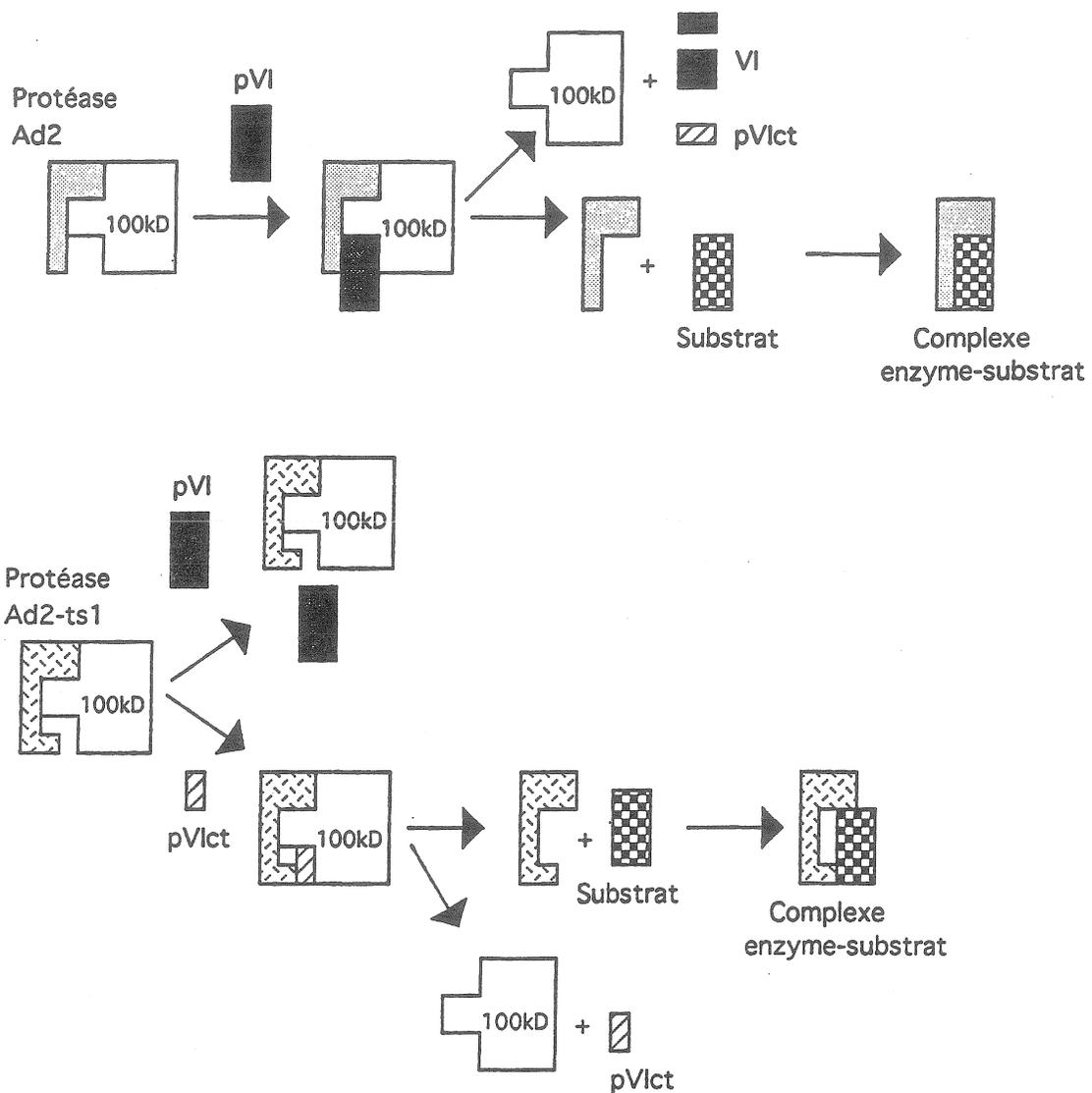


FIGURE 8-Modèle du mécanisme de transport de la protéase adénovirale.

Il est proposé par notre groupe, tenant compte des résultats obtenus, que la protéase adénovirale est liée à la protéine virale de 100kD. Cette protéine aurait le rôle d'assurer le transport de la protéase du cytoplasme au noyau. La protéine virale VI viendrait ensuite déloger la protéase de la protéine 100kD afin qu'elle soit active. La protéase mutante du virus Ad2-ts1 ne peut pas être délogée par la protéine VI comme dans le virus du type sauvage et donc doit être délogée par le peptide pVIct afin d'être délogée. La protéase Ad2-ts1 est inactive en absence du peptide pVIct. En présence du peptide son activité est moindre que la protéase de type sauvage, ce qui est expliqué par la présence de la mutation qui influence un peu l'activité.

Cette hypothèse a été proposée à partir des résultats présentés dans l'article de Rancourt *et al.* (1995), des résultats non publiés obtenus dans le laboratoire et des résultats de la recherche du logiciel Blast avec la fonction blastp dans la banque de données Swissprot.

site de clivage nécessite des séquences qui précèdent ou suivent la séquence connus afin de permettre la protéase de reconnaître son substrat.

La peptothèque de phages a permis d'isoler des ligands pour la protéase adénovirale. La présence des sites de clivage connus, l'homologie au peptide pVIct et les protéines 100kD et pTP de l'Ad2, parmi les séquences isolées, nous indiquent que la technique utilisée est favorable afin d'isoler des ligands de la protéase. Les autres séquences qui n'ont pas été reconnues comme étant des séquences connues, ni des homologies contre les protéines adénovirales n'indiquent pas que ces séquences sont non spécifiques à la protéase adénovirale. Il existe le phénomène des mimotopes, des épitopes qui n'ont aucune homologie au niveau des a.a. retrouvés, mais la structure tridimensionnelle et la forme de l'épitope sont très homologues (Smith *et al.*, 1993). Il est donc possible que les séquences obtenues qui ne sont pas reconnues soient des ligands spécifiques de la protéase.

Cette étude a donc permis de répondre à certaines questions au niveau du mécanisme de la protéase et la maturation de l'adénovirus tel qu'on le connaît tout en donnant des possibilités de la présence d'un peptide inhibiteur mimotope parmi les séquences qui n'ont pas été reconnues. Le but de ce projet de recherche, soit identifier des ligands à la protéase adénovirale a donc été atteint. Ce projet nous a fait progresser au niveau des connaissances sur la protéase adénovirale et de là, son importance au niveau du cycle infectieux de l'adénovirus.

ANNEXE 1: Tableau des abréviations des acides aminés.

<u>Acide aminé</u>	<u>Abréviations à trois lettres</u>	<u>Symbole d'une lettre</u>
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Acide aspartique	Asp	D
Asparagine ou acide aspartique	Asx	B
Cysteine	Cys	C
Glutamine	Gln	Q
Acide glutamique	Glu	E
Glutamine ou acide glutamique	Glx	Z
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Iso	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Methionine	Met	M
Phenylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Serine	Ser	S
Threonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

(Tiré de Stryer, 1988)

ANNEXE 2: Protéines homologues retrouvées à partir de la banque de données Swissprot et les informations détaillées du logiciel Blast avec la fonction blastp.

Informations retrouvées:

- nom et code de la protéine
- longueur de la protéine
- statistiques d'homologie de la recherche tel que données par le logiciel Blast
- région de l'homologie avec la protéine

8. name="sp|P19751|RRPA_CVMJH" RNA-DIRECTED RNA POLYMERASE (ORF1A) (EC 2.7.7.48).

Length = 4488, Score = 41 (20.0 bits), Expect = 5.0, Sum P(2) = 0.99, Identities = 7/7 (100%), Positives = 7/7 (100%)

Query: 7 GGSVGHY 13

GGSVGHY

Sbjct: 1884 GGSVGHY 1890

10. name="sp|P18126|GUNB_PSEFL" ENDOGLUCANASE B PRECURSOR (EC 3.2.1.4) (ENDO-1,4-BETA-GLUCANASE) (CELLULASE) (EGB).

Length = 511, Score = 34 (15.9 bits), Expect = 4.6, Sum P(2) = 0.99, Identities = 5/9 (55%), Positives = 6/9 (66%)

Query: 1 WGKGFERSV 9

WG GF S+

Sbjct: 40 WSGFTASI 48

11. name="sp|P30526|TRPE_BACCA" ANTHRANILATE SYNTHASE COMPONENT I (EC 4.1.3.27).

Length = 508, Score = 40 (18.9 bits), Expect = 8.3, P = 1.0, Identities = 8/14 (57%), Positives = 11/14 (78%)

Query: 1 VRRFIAKADIKQAV 14

V+R+IA D+ QAV

Sbjct: 242 VKRYIAAGDVFQAV 255

12. name="sp|P03269|TERM_ADE02" DNA TERMINAL PROTEIN (BELLETT PROTEIN).

Length = 653, Score = 28 (13.5 bits), Expect = 88., Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/5 (100%), Positives = 5/5 (100%); Score = 20 (9.6 bits), Expect = 6.9, Sum P(3) = 1.0, Identities = 4/5 (80%), Positives = 4/5 (80%); Score = 20 (9.6 bits), Expect = 88., Sum P(2) = 1.0, Identities = 3/5 (60%), Positives = 4/5 (80%)

Query: 3 MRGFG 7 8 AGQSE 12 13 LNAPC 17

MRGFG AGQ E L+ PC

Sbjct: 154 MRGFG 158 184 AGQEE 188 268 LSLPC 272

(name="sp|P04499|TERM_ADE05" DNA TERMINAL PROTEIN (BELLETT PROTEIN). Cette protéine à les mêmes séquences homologues que la protéine de l'Ad2.)

13. name="sp|P25943|VT2_SFVKA" TUMOR NECROSIS FACTOR SOLUBLE RECEPTOR PRECURSOR (PROTEIN T2).

Length = 325, Score = 31 (15.1 bits), Expect = 7.4, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/8 (62%), Positives = 7/8 (87%); Score = 23 (11.2 bits), Expect = 7.4, Sum P(2) = 1.0, Identities = 4/5 (80%), Positives = 4/5 (80%)

Query: 10 VLVGRNGC 17 1 CGPVS 5
 +L G+NGC CGP S
 Sbjct: 113 LLKGQNGC 120 53 CGPGS 57

14. name="sp|P12965|KMOS_XENLA" MOS PROTO-ONCOGENE SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE (EC 2.7.1.-) (PP39-MOS).

Length = 359, Score = 35 (17.0 bits), Expect = 0.64, Sum P(2) = 0.47 Identities = 6/8 (75%), Positives = 7/8 (87%); Score = 27 (13.1 bits), Expect = 0.64, Sum P(2) = 0.47, Identities = 4/6 (66%), Positives = 6/6 (100%)

Query: 1 CFGRPKLL 8 12 LGSELC 17
 C GRP+LL LG+E+C
 Sbjct: 42 CSGRPRL 49 161 LGAEIC 166

15. name="sp|P39749|FEN1_MOUSE" FLAP ENDONUCLEASE-1.

Length = 378, Score = 41 (19.8 bits), Expect = 4.9, P = 0.99 Identities = 7/11 (63%), Positives = 10/11 (90%)

Query: 2 DGELTSLGLF 12
 +GE TSL+G+F
 Sbjct: 57 EGETTSLMGMF 67

16. name="sp|P09562|RPOA_MAIZE" DNA-DIRECTED RNA POLYMERASE ALPHA CHAIN (EC 2.7.7.6).

Length = 341, Score = 42 (19.6 bits), Expect = 4.6, P = 0.99 Identities = 6/12 (50%), Positives = 10/12 (83%)

Query: 4 NSSGVKSGKMLW 15
 NS G++ GK++W
 Sbjct: 312 NSFGMEDGKLIW 323

17. name="sp|P00891|CISY_ECOLI" CITRATE SYNTHASE (EC 4.1.3.7).

Length = 427, Score = 43 (20.5 bits), Expect = 2.7, P = 0.93 Identities = 8/14 (57%), Positives = 11/14 (78%)

Query: 1 CGISGLLSAWYGTS 14
 CGI+G L+ A+Y S
 Sbjct: 136 CGITGALAAFYHDS 149

18. name="sp|Q02817|MUC2_HUMAN" MUCIN 2 (INTESTINAL MUCIN 2)
(FRAGMENTS).

Length = 2274, Score = 36 (17.0 bits), Expect = 6.2, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/11
(45%), Positives = 9/11 (81%)

Query: 1 CSAEGLLLASW 11
 C+A+G++L W
Sbjct: 14 CTAKGVMLWGW 24

19. name="sp|P25304|AGRI_RAT" AGRIN PRECURSOR.

Length = 1959, Score = 27 (12.8 bits), Expect = 2.7, Sum P(3) = 0.93 Identities = 6/8
(75%), Positives = 8/8 (100%); Score = 26 (12.3 bits), Expect = 2.7, Sum P(3) = 0.93,
Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%); Score = 25 (11.9 bits), Expect = 2.7,
Sum P(3) = 0.93, Identities = 3/3 (100%), Positives = 3/3 (100%)

Query: 5 VTSLASNI 12 14 GGTC 17 1 CWR 3
 VTSLA++I GGTC CWR
Sbjct: 942 VTSLATSI 949 1232 GGTC 1235 335 CWR 337

20. name="sp|P03878|DNE2_YEAST" DNA ENDONUCLEASE I-SCEII (DNA
ENDONUCLEASE AI4).

Length = 235, Score = 29 (14.0 bits), Expect = 8.6, Sum P(2) = 1.0, Identities = 4/6
(66%), Positives = 6/6 (100%); Score = 24 (11.5 bits), Expect = 8.6, Sum P(2) = 1.0,
Identities = 4/5 (80%), Positives = 5/5 (100%)

Query: 5 EWIAGL 10 12 LLGGN 16
 +W+AGL +LGGN
Sbjct: 5 QWLAGL 10 152 ILGGN 156

21. name="sp|P24932|L100_ADE02" LATE 100 KD PROTEIN

Length = 805, Score = 43 (20.0 bits), Expect = 4.6, P = 0.99, Identities = 9/15 (60%),
Positives = 9/15 (60%)

Query: 1 RDPLGLGGGDRGTLG 15
 R G GGGD G LG
Sbjct: 736 RGGFGRGGGDDGRLG 750

22. name="sp|P12390|ACHN_RAT" NEURONAL ACETYLCHOLINE RECEPTOR
PROTEIN, BETA-2 CHAIN PRECURSOR

Length = 503, Score = 33 (16.5 bits), Expect = 3.7, Sum P(2) = 0.97, Identities = 6/6
(100%), Positives = 6/6 (100%); Score = 23 (11.5 bits), Expect = 3.7, Sum P(2) = 0.97,
Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%)

Query: 1 CSGVLG 6 9 RCAR 12
 CSGVLG RCAR
Sbjct: 23 CSGVLG 28 358 RCAR 361

24. name="sp|P16423|POLR_DROME"RETROVIRUS-RELATED POL POLYPROTEIN
(PROTEASE (EC 3.4.23.-); REVERSE TRANSCRIPTASE (EC 2.7.7.49);
ENDONUCLEASE) (TYPE II RETROTRANSPOSABLE ELEMENT R2DM).
Length = 1057, Score = 39 (19.0 bits), Expect = 8.8, P = 1.0, Identities = 7/11 (63%),
Positives = 9/11 (81%)

Query: 7 SIGLMRGILGC 17
S+ +MRG LGC
Sbjct: 1032 SVQVMRGS LGC 1042

25. name="sp|P04626|ERB2_HUMAN" ERBB-2 RECEPTOR PROTEIN-TYROSINE
KINASE PRECURSOR (EC 2.7.1.112).
Length = 1255, Score = 36 (17.9 bits), Expect = 5.2, Sum P(2) = 0.99, Identities = 7/8
(87%), Positives = 8/8 (100%)

Query: 6 LGVVFGIM 13
LGVVFGI+
Sbjct: 667 LGVVFGIL 674

26. name="sp|P39123|PHSG_BACSU" GLYCOGEN PHOSPHORYLASE (EC 2.4.1.1).
Length = 798, Score = 30 (14.4 bits), Expect = 6.4, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/7
(71%), Positives = 7/7 (100%); Score = 28 (13.4 bits), Expect = 6.4, Sum P(2) = 1.0,
Identities = 4/4 (100%), Positives = 4/4 (100%)

Query: 2 DVLKQRE 8 14 GPDC 17
D+LK+RE GPDC
Sbjct: 427 DILKERE 433 670 GPDC 673

27. name="sp|P38066|GCH2_YEAST"PROBABLE GTP CYCLOHYDROLASE II (EC
3.5.4.25).
Length = 345, Score = 40 (19.3 bits), Expect = 6.4, P = 1.0, Identities = 6/9 (66%),
Positives = 9/9 (100%)

Query: 2 DMGVGNVRM 10
D+G+GNVR+
Sbjct: 244 DLGIGNVRL 252

28. name="sp|P30660|EXON_PRVN3" ALKALINE EXONUCLEASE (EC 3.1.11.-)
(FRAGMENT).
Length = 150, Score = 31 (14.8 bits), Expect = 7.7, Sum P(2) = 1.0, Identities = 6/6
(100%), Positives = 6/6 (100%)

Query: 2 RHGLAA 7
RHGLAA
Sbjct: 53 RHGLAA 58

29. name="sp|P02790|HEMO_HUMAN" HEMOPEXIN PRECURSOR (BETA-1B-GLYCOPROTEIN) (FRAGMENT).

Length = 441, Score = 33 (15.8 bits), Expect = 7.1, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/10 (50%), Positives = 8/10 (80%)

Query: 3 REFMWNVAEG 12
 RE+ W++ A G
 Sbjct: 145 REWFWDLATG 154

Séquences obtenues à partir de la recherche avec la banque de données Genbank et le logiciel Blast à partir de la fonction tblastn.

Informations retrouvées:

- même que ci-haut
- indique le cadran de lecture où il y a homologie

1. name="gb|T03784|T03784" IB897B Homo sapiens cDNA clone IB897B 3'end similar to Human M2-type pyruvate kinase mRNA.

Length = 437, Plus Strand HSPs: Score = 40 (18.3 bits), Expect = 5.8, Sum P(2) = 1.0, Identities = 6/7 (85%), Positives = 7/7 (100%), Frame = +2; Score = 26 (11.9 bits), Expect = 5.8, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/7 (71%), Positives = 6/7 (85%), Frame = +1

Query: 1 WGKVEGG 7 9 VGHYLSA 15
 WGK+EGG VGH L+A
 Sbjct: 71 WGKMEGG 91 403 VGHMLAA 423

10. name="gb|M27316|HUMTRS" Human transfer RNA-Ser.

Length = 90, Plus Strand HSPs: Score = 26 (12.1 bits), Expect = 3.2, Sum P(2) = 0.96, Identities = 5/10 (50%), Positives = 8/10 (80%), Frame = +3; Score = 22 (10.3 bits), Expect = 3.2, Sum P(2) = 0.96, Identities = 3/4 (75%), Positives = 3/4 (75%), Frame = +2

Query: 6 ERSVGYLSG 15 1 WGKG 4
 +R V ++LSG WG G
 Sbjct: 57 DRVVQFHLSG 86 23 WGAG 34

13. name="emblX59550|ECRCG" E.coli recG DNA.

Length = 3041, Minus Strand HSPs: Score = 46 (22.3 bits), Expect = 2.4, Sum P(2) = 0.91, Identities = 8/13 (61%), Positives = 11/13 (84%), Frame = -2

Query: 1 CGPVSQVFGVVLVG 13
 C PV++V GVL+G
 Sbjct: 1453 CKPVAEVIGVLLG 1415

14. name="gb|R13957|R13957" yf68c06.r1 Homo sapiens cDNA clone 27604 5'.
 Length = 497, Minus Strand HSPs: Score = 54 (26.2 bits), Expect = 1.9, P = 0.85,
 Identities = 10/16 (62%), Positives = 13/16 (81%), Frame = -1

Query: 2 FGRPKLLIKALGSELC 17
 FG+P +L+KA G ELC
 Sbjct: 164 FGKP*VLVKAEGHEL C 117

15. name="emb|X04087|HSCATG3" Human gene for catalase (EC 1.11.1.6.) exon 3
 mapping to chromosome 11, band p13.
 Length = 218, Minus Strand HSPs: Score = 31 (15.0 bits), Expect = 6.3, Sum P(2) = 1.0,
 Identities = 6/9 (66%), Positives = 7/9 (77%), Frame = -1; Score = 28 (13.5 bits), Expect
 = 6.3, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/7 (71%), Positives = 5/7 (71%), Frame = -1

Query: 9 LGLFGAVGC 17 1 CDGELTS 7
 LG+FG V C CDG L S
 Sbjct: 101 LGVFGNVMC 75 143 CDGSLLS 123

16. name="gb|M21940|HUMCYPPMPB" Human cytochrome P-450 S-mephenytoin 4-
 hydroxylase (P-450mp) mRNA, 3' end, clone MP-4.
 Length = 1441, Minus Strand HSPs: Score = 45 (21.0 bits), Expect = 6.0, Sum P(2) =
 1.0, Identities = 6/9 (66%), Positives = 9/9 (100%), Frame = -1; Score = 24 (11.2 bits),
 Expect = 6.0, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/7 (71%), Positives = 6/7 (85%), Frame = -2

Query: 9 KSGKMLWVC 17 3 ENSSGVK 9
 KSGK++W+C +N SGVK
 Sbjct: 856 KSGKLIWLC 830 1098 DNWSGVK 1078

17. name="gb|K01216|ACBERBBH" Avian erythroblastosis virus (AEV-H) v-erb-B
 oncogene.
 Length = 2091, Minus Strand HSPs: Score = 42 (20.0 bits), Expect = 3.5, Sum P(2) =
 0.97, Identities = 7/10 (70%), Positives = 8/10 (80%), Frame = -2; Score = 29 (13.8 bits),
 Expect = 3.5, Sum P(2) = 0.97, Identities = 4/8 (50%), Positives = 6/8 (75%), Frame = -1

Query: 1 CGISGLLSAW 10 9 AWYGTSEM 16
 CG SG+LS W AW+G S +
 Sbjct: 1808 CGNSGILSPW 1779 519 AWFGASPL 496

18. name="dbj|D12363|HUM00TB048" Human HepG2 3'-directed MboI cDNA, clone
 tb048.
 Length = 94, Plus Strand HSPs: Score = 41 (19.4 bits), Expect = 8.3, P = 1.0, Identities
 = 6/9 (66%), Positives = 7/9 (77%), Frame = +1

Query: 9 ASWLVNSVC 17
 A WL+NS C
 Sbjct: 58 AGWLINSTC 84

19. name="gb|U11097|HSHIOMT8" Human hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) gene, exon 8.

Length = 250, Plus Strand HSPs: Score = 54 (25.6 bits), Expect = 1.6, P = 0.80, Identities = 9/17 (52%), Positives = 11/17 (64%), Frame = +1

Query: 1 CWRSVTSLASNLGGTC 17

CWR T+LAS + G C

Sbjct: 136 CWRGSTTLASQVSCGVC 186

20. name="gb|T51506|T51506" yb17h08.s1 Homo sapiens cDNA clone 71487 3'.

Length = 416, Plus Strand HSPs: Score = 39 (18.8 bits), Expect = 7.0, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/7 (71%), Positives = 6/7 (85%), Frame = +3; Score = 24 (11.5 bits), Expect = 7.0, Sum P(2) = 1.0, Identities = 4/6 (66%), Positives = 5/6 (83%), Frame = +3

Query: 1 CRPAEWI 7 12 LLGGNC 17

CRPA W+ LLG +C

Sbjct: 219 CRPARWV 239 384 LLGNSC 401

22. name="emb|X56060|RNDESOXI" Rat mRNA for deoxyribonuclease I (EC 3.1.21.1).

Length = 1156, Plus Strand HSPs: Score = 39 (19.5 bits), Expect = 3.2, Sum P(2) = 0.96, Identities = 6/9 (66%), Positives = 9/9 (100%), Frame = +1

Query: 2 SGVLGVVRC 10

SG+LG++RC

Sbjct: 220 SGLLGILRC 246

23. name="emb|X55005|HSCERBAR" Human c-erbA-1 mRNA for thyroid hormone receptor alpha.

Length = 2288, Plus Strand HSPs: Score = 40 (19.6 bits), Expect = 9.3, Sum P(2) = 1.0, Identities = 8/11 (72%), Positives = 9/11 (81%), Frame = +2; Score = 27 (13.2 bits), Expect = 9.3, Sum P(2) = 1.0, Identities = 4/5 (80%), Positives = 5/5 (100%), Frame = +2

Query: 3 AFLGGLDRFSS 13 13 SGGRC 17

+FL LDRFSS +GGRC

Sbjct: 1799 SFLSSLDRFSS 1831 2042 AGGRC 2056

24. name="gb|M27734|MUSKER1A" Mouse acidic keratin type I mRNA, complete cds.

Length = 1585, Minus Strand HSPs: Score = 37 (18.0 bits), Expect = 9.6, Sum P(2) = 1.0, Identities = 7/10 (70%), Positives = 8/10 (80%), Frame = -2; Score = 29 (14.1 bits), Expect = 9.6, Sum P(2) = 1.0, Identities = 5/9 (55%), Positives = 6/9 (66%), Frame = -1

Query: 1 CASVLDISGL 10 9 GLMRGILGC 17

CAS LD +GL GL G +GC

Sbjct: 903 CASQLDDLGL 874 691 GLQAGSVGC 665

25.name="gb|L14855|BOVNEURXIA" Bos taurus neurexin I-alpha mRNA, complete cds.
 Length = 6349, Plus Strand HSPs: Score = 37 (18.4 bits), Expect = 9.4, Sum P(2) = 1.0,
 Identities = 5/9 (55%), Positives = 8/9 (88%), Frame = +2; Score = 32 (15.9 bits), Expect
 = 9.4, Sum P(2) = 1.0, Identities = 4/9 (44%), Positives = 8/9 (88%), Frame = +2

Query: 9 VFGIMQRGC 17 1 CYAQQGLGVV 9
 ++G+ QRGC C+ QG+G++
 Sbjct: 2660 LYGVSQRGC 2686 2189 CHFQGIGIL 2215

26.name="gb|M84524|MUS6MGDMT" Mouse O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
 mRNA, complete cds.
 Length = 946, Minus Strand HSPs: Score = 52 (24.9 bits), Expect = 5.0, P = 0.99,
 Identities = 8/9 (88%), Positives = 8/9 (88%), Frame = -1

Query: 9 RGLGWGPDC 17
 RG GWGPDC
 Sbjct: 460 RG*GWGPDC 434

27. name="dbj|D10879|HS1ULR" Herpes simplex virus type 1 long unique region UL.
 Length = 108,360, Minus Strand HSPs:
 Score = 51 (24.6 bits), Expect = 6.6, P = 1.0, Identities = 8/17 (47%), Positives = 11/17
 (64%), Frame = -2

Query: 1 CDMGVGNVRMHAEIGTC 17
 C MGVG+ MH + +C
 Sbjct: 89270 CSMGVGSQDMHPRLNSC 89220

28. name="emb|Z26590|MV4LYSAB" Bacteriophage mv4 lysA and lysB genes.
 Length = 2796, Minus Strand HSPs: Score = 43 (20.6 bits), Expect = 2.3, Sum P(2) =
 0.90, Identities = 7/11 (63%), Positives = 10/11 (90%), Frame = -1; Score = 30 (14.4
 bits), Expect = 2.3, Sum P(2) = 0.90, Identities = 5/7 (71%), Positives = 5/7 (71%),
 Frame = -1

Query: 7 ANLVEDLTTRC 17 1 CRHGLAA 7
 AN ++DLT+RC CRHG A
 Sbjct: 480 ANYIKDLTSRC 448 1254 CRHGRVA 1234

29. name="emb|Z21487|SCCHRIIFG" S.cerevisiae RIM, MSI1, PGI, and ribosomal
 protein L21 genes.
 Length = 30,981, Plus Strand HSPs: Score = 52 (24.9 bits), Expect = 4.8, P = 0.99,
 Identities = 8/11 (72%), Positives = 9/11 (81%), Frame = +3

Query: 1 CHREFMWNVAE 11
 CHRE MWN+ E
 Sbjct: 17988 CHRE*MWNIKE 18020

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tous ceux qui ont su m'encourager lors de ma maîtrise.

Mes collègues de laboratoire ont su me guider ainsi que me faire sentir chez moi à l'extérieur et loin de ma famille, en fin de compte, ils sont devenus ma famille.

Ma jumelle Claudine, nos intérêts communs ainsi que nos manières communes à fait que nous sommes devenues de bonnes amies. Je te souhaite tout le mieux en Alabama, à toi et à Alain.

Mounir, un bon ami avec lequel je pouvais partager mes souvenirs de chez moi. Bonne chance à toi et à Magda et le ou la petit(e)?

Lise, qui était toujours là pour m'aider quand j'avais des petits problèmes techniques, avec qui on peut toujours parler et avec qui on peut toujours rigoler.

Sira, une amie spéciale qui m'a fait voir mon pays et le sien au travers de ses yeux. Et le petit Momo, le premier petit bébé de peau noire que j'ai pu admirer.

Hossein, un compagnon qui m'a présenté la religion musulmane dans tous ses aspects au travers de ses yeux.

Cynthia, une très bonne amie avec qui je me suis bien amusée, bien rigolé et qui a rendu le workout un peu plus intéressant encore! Be sure to come and see me in Moncton, sometime in your lifetime!!

Sucheta, une personne qui a ajouté de l'atmosphère au laboratoire.

Le Dr Weber, qui a eu confiance dans mes capacités et qui m'a donné une position dans son laboratoire. Il a aussi su me guider, m'aider et m'encourager quand les choses n'allaient pas toujours bien, ou plutôt comme on le veut; ce qui arrive souvent dans un laboratoire de recherche!!

Mes parents et mon frère qui ne m'ont jamais oublié et qui ont toujours été très près quand j'en avais besoin.

Merci maman pour tes coups de téléphone à chaque semaine qui me tenait au courant des nouvelles de la maison. Merci pour ton encouragement, ta confiance, et surtout ton amour!!

Merci Christian pour tes petites visites, tu m'emportais toujours la sensation d'être à nouveau avec ma famille. Bonne chance avec tes études, tu vas sûrement te rendre loin dans la vie!! (sounds familiar ?!)

Merci papa pour ton encouragement et ta confiance, ils ont su bien me guider.

Ma filleule Janie, qui me rappelait toujours qu'elle n'était tout de même pas si loin, que le courrier peut quand même transmettre son amour avec ses beaux dessins et ses mots.

To my partner in life Benji, who believed in me enough to let me come and study 1200km away, who encouraged me when I was feeling low, and who most of all, never let me forget that he loved me and was patiently, or rather painstakingly, waiting for my return!! I love you and I'm coming home!!

BIBLIOGRAPHIE

- Arsenault, H. et J.M. Weber (1993) Mapping of the mAb73 Epitope on Ad2 E1A Proteins with Random Peptide Libraries and Deletion Mutants, *FEMS Letters*, 114:37-40.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, 72:248-254.
- Cepko, C.L. et P.A. Sharp (1982) Assembly of Adenovirus Major Capsid Protein is Mediated by a Nonvirion Protein, *Cell*, 31:407-415.
- Chen, P.A., D.A. Ornelles, et T. Shenk (1993) The Adenovirus L3 23-Kilodalton Proteinase Cleaves the Amino-Terminal Head from Cytokeratin 18 and Disrupts the Cytokeratin Network of HeLa Cells, *J. Virol.*, 67:3507-3514.
- Christian, R.B., R.N. Zuckermann, J.M. Kerr, L. Wang et B.A. Malcolm (1992) Simplified Methods for Construction, Assessment and Rapid Screening of Peptide Libraries in Bacteriophage, *J. Mol.Biol.*, 227:711-718.
- Cwirla, S.E., E.A. Peters, R.W. Barrett, et W.J. Dower (1990) Peptides on Phage: A Vast Library of Peptides for Identifying Ligands, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:6378-6382.
- Devlin, J.J., L.C. Panganiban, et P.E. Devlin (1990) Random Peptide Libraries: A Source of Specific Protein Binding Molecules, *Science*, 249:404-406.
- Diouri, M., K.F. Geoghegan et J.M. Weber (1995) Functional Characterization of the Adenovirus Proteinase Using Fluorogenic Substrates, *Prot. Pept. Lett.*, 2:363-370.
- Dower W.J. et S.P.A. Fodor (1991) Chapter 28. The Search for Molecular Diversity (II): Recombinant and Synthetic Randomized Peptide Libraries, *Ann. Rep. Med. Chem.*, 26: 271-280.
- Dulbecco R. et H.S. Ginsberg (1988) *Virology*, Second Edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Pennsylvania, pp.147-160.
- Enders, J.F., J.A. Bell, J.H. Dingle, T. Francis, M.R. Hilleman, R.J. Huebner, A.M.-M. Payne (1956) "Adenoviruses": Group Name Proposed for New Respiratory-Tract Viruses, *Science*, 124:119.
- Fields B.N. et M.S. Horwitz (1985) *Virology*, Raven Press, New York, pp. 433-495.
- Gambke, C. et W. Deppert (1983) Specific Complex of the Late Nonstructural 100,000-Dalton Protein with Newly Synthesized Hexon in Adenovirus Type 2-Infected Cells, *Virology*, 124:1-12.
- Goodson, R.J., M.V. Doyle, S.E. Kaufman, et S. Rosenberg (1994) High-Affinity Urokinase Receptor Antagonists Identified with Bacteriophage Peptide Display, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 91:7129-7133.

- Hannan, C., L.H. Raptis, C.V. Déry, et J. Weber (1983) Biological and Structural Studies with an Adenovirus Type 2 Temperature-Sensitive Mutant Defective for Uncoating, *Intervirology*, 19:213-223.
- Houde A. et J.M. Weber (1990) Adenovirus Proteinases: Comparison of Amino Acid Sequences and Expression of the Cloned cDNA in *Escherichia coli*, *Gene*, 88:269-273.
- Keyvani-Amineh, H., P. Labrecque, F. Cai, E.B. Carstens et J.M. Weber (1995) Adenovirus Protease Expressed in Insect Cells Cleaves Adenovirus Proteins, Ovalbumin and Baculovirus Protease in the Absence of Activating Peptide, *Virus Res.*, 37:87-97.
- Kozarski K.F. et J.M. Wilson (1993) Gene Therapy: Adenovirus Vectors, *Curr. Opin. Gen. Dev.*, 3:499-503.
- Kräusslich H.-G. et E. Wimmer (1988) Viral Proteinases, *Annu. Rev. Biochem.*, 57:701-754.
- Lawson M.A. et B.L. Semler (1990) Picornavirus Protein Processing - Enzymes, Substrates and Genetic Regulation, *Curr. Top. Micro. Immunol.*, 161:49-85.
- Mangel, W.F., W.J. McGrath, D.L. Toledo, et C.W. Anderson (1993) Viral DNA and a Viral Peptide can Act as Cofactors of Adenovirus Virion Proteinase Activity, *Nature*, 361:274-275.
- Matthews, D.J. et J.A. Wells (1990) Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display, *Science*, 260:1113-1117.
- Mirza, A. et J.M. Weber (1980) Infectivity and Uncoating of Adenovirus Cores, *Intervirology*, 13:307-311.
- Parnley, S.F. et G.P. Smith (1988) Antibody-Selectable Filamentous fd Phage Vectors: Affinity Purification of Target Genes, *Gene*, 73:305-318.
- Rancourt, C., K. Tihanyi, M. Bourbonnière, et J.M. Weber (1994) Identification of Active-Site Residues of the Adenovirus Endopeptidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:844-847.
- Rancourt, C., H., Keyvani-Amineh, S. Sircar, P. Labrecque, et J.M. Weber (1995) Proline 137 is Critical for Adenovirus Protease Encapsidation and Activation but Not Enzyme Activity, *Virology*, 209:167-173.
- Riley, D. et S.J. Flint (1993) RNA-Binding Properties of a Translational Activator, the Adenovirus L4 100-Kilodalton protein, *J. Virol.*, 67:3586-3595.
- Roberts, B.L. W. Markland, A. C. Ley, R.B. Kent, D.W. White, S.K. Guterman, et R.C. Ladner (1990a) Directed Evolution of a Protein: Selection of Potent Neutrophil Elastase Inhibitors Displayed on M13 Fusion Phage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:2429-2433.
- Roberts, B.L., W. Markland, K. Siranosian, M.J. Saxena, S.K. Guterman, et R.C. Ladner (1990b) Protease Inhibitor Display M13 Phage: Selection of High-Affinity Neutrophil Elastase Inhibitors, *Gene*, 121:9-15.

- Rowe, W.P., R.J. Huebner, L.K. Gillmore, R.H. Parrott, et T.G. Ward (1953) Isolation of a Cytogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture, *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 84:570
- Scott, J.K. et G.P. Smith (1990) Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library, *Science*, 249:386-390.
- Smith, G.P., D.A. Schultz, et J.E. Ladbury (1993) A Ribonuclease S-Peptide Antagonist Discovered with a Bacteriophage Display Library, *Gene*, 128:37-42.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*, 3^e édition, W.H. Freeman & Company, New York, pp.15-42.
- Tihanyi, K., M. Bourbonnière, A. Houde, C. Rancourt, et J.M. Weber (1993) Isolation and Properties of Adenovirus Type 2 Proteinase, *J. Biol. Chem.*, 268:1780-1785.
- Villar, H.O. et L.M. Kauvar (1994) Amino Acid Preferences at Protein Binding Sites, *FEBS Letters*, 349:125-130.
- Weber, J.M. (1976) Genetic Analysis Type 2. III. Temperature Sensitivity of Processing of Viral Proteins, *J. Virol.*, 17:462-471.
- Weber, J.M. (1990) The Adenovirus Proteinases, *Sem. Virol.*, 1:379-384.
- Weber, J.M. et K. Tihanyi (1994) Adenovirus Endopeptidases, *Meth. Enzymol.* 244:595-604.
- Weber, J.M. (1995) Adenovirus endopeptidase and Its Role in Virus Infection, *Curr. Top. Micro. Immunol.* 199/I:227-235.
- Webster A. et G. Kemp (1993) The Active Adenovirus Protease is the Intact L3 23K Protein, *J. Gen.Virol.*, 74:1415-1420.
- Webster, A., S. Russell, P. Talbot, W.C. Russell, et G.D. Kemp (1989a) Characterization of the Adenovirus Proteinase: Substrate Specificity, *J. Gen. Virol.*, 70:3225-3234.
- Webster, A., W.C. Russell et G.D. Kemp (1989b) Characterization of the Adenovirus Proteinase: Development and Use of a Specific Peptide Assay, *J. Gen. Virol.*, 70:3215-3223.
- Webster, A., R.T. Hay, et G. Kemp (1993) The Adenovirus Protease is Activated by a Virus-Coded Disulphide-Linked Peptide, *Cell*, 72:97-104.
- Webster, A., I.R. Leith et R.T. Hay (1994) Activation of Adenovirus-Coded Protease and Processing of Preterminal Protein, *J. Virology*, 68:7292-7300.
- Zacher, A.N., C.A. Stock, J.W. Golden, et G.P. Smith (1980) A New Filamentous Phage Cloning Vector: fd-tet, *Gene*, 9:127-140.