

Bull. Acad. Vét. de France, 1991, 64, 365-373

## COMMUNICATIONS

---

### **Utilisation de l'hydrochlorure de D - (6-<sup>3</sup>H) glucosamine dans le procédé de purification et de séparation des sous-unités glucoprotéiques du virus *Para-influenzae* 3 bovin (PI3)**

par N.S. MILITCH\*, G. GADJANSKI-OMEROVITCH\*\*, R. ASANIN\*\*  
et B. MARKOVITCH\*\*

La note est présentée par Marc CATSARAS

---

#### RÉSUMÉ

L'hydrochlorure de D - (6-<sup>3</sup>H) glucosamine a été utilisé comme marqueur pour purifier et séparer les sous-unités glucoprotéiques du virus *Para-influenzae* 3 bovin (PI3). Les résultats obtenus, en particulier avec le poly-éthylène-glycol 6 000 pour la concentration, ont été parfaitement démonstratifs. Une expérimentation sur la mise au point d'un vaccin est possible.

*Mots clés* : Virus PI3 - Sous-unités glucoprotéiques - Tritium-glucosamine.

#### SUMMARY

#### UTILIZATION OF HYDROCHLORATE D - (6-<sup>3</sup>H) GLUCOSAMINE IN THE PROCESS FOR PURIFYING AND SEPARATING THE BOVINE PARA-INFLUENZA 3 VIRUS GLYCOPROTEIC SUB-UNITS

Hydrochlorate D - (6-<sup>3</sup>H) glucosamine was used as mark-product for purifying and separating the bovine *Para-influenza* 3 virus glycoproteic sub-units. The results obtained, particularly with poly-ethylen-glycol 6 000 for concentration, were perfectly demonstrative. Experiment for vaccine assay is possible.

*Key words* : PI3 Virus - Glycoproteic sub-units - Tritium-glucosamine.

---

\* Chercheur.

\*\* Professeur.

Institut de Microbiologie de la Faculté Vétérinaire de l'Université de Belgrade,  
Bulevar JNA 18.

## INTRODUCTION

Le problème de l'isolement des glucoprotéines des enveloppes du virus *Para-influenzae* 3 dans sa forme active a été étudié par divers auteurs : W.E. MOUNTCASTLE *et al.* en 1971 [13], A. SCHEID *et al.* en 1972 [16], S.D. THOMPSON *et al.* en 1988 [18].

Les sous-unités contiennent les deux glucoprotéines transmembranaires (hémagglutine-neuraminidase HN et protéine fusionique F) qui forment des projections en pointe sur la membrane du virus (M. J. SCHLESINGER et S. SCHLESINGER en 1987 [17]). Elles représentent 2 protéines sur les 6 structurales qui existent dans le virus *Para-influenzae* 3 (PI3), agent causal du para-influenza bovin (P. PANIGRAHI *et al.* en 1987 [14]).

Avec la méthode du marquage spécifique des antigènes superficiels du virus PI3 par des radioisotopes ( $\beta$ -émetteurs), on peut confirmer exactement la présence et la quantité des sous-unités glucoprotéiques. On peut aussi faire cette mesure au cours de toutes les phases du processus de purification et d'extraction des fractions glucoprotéiques. Toutes les recherches ont été faites jusqu'à présent en utilisant les radioisotopes du Tritium ( $^3\text{H}$  hydrate de bore,  $^3\text{H}$ -leucine,  $^3\text{H}$ -lysine), du carbone actif ( $^{14}\text{C}$  - acide aminé) et du Soufre ( $^{35}\text{S}$  méthionine). Cependant, les radioisotopes précités peuvent se lier à d'autres fractions des virions, comme l'ont montré : A. LUUKKONEN *et al.* en 1977 [9]), SHEID *et al.* en 1974 [15], B. MOREIN *et al.* en 1983 [12] et S. L. WECHSLER *et al.* en 1985 [19].

Les recherches de H.D. KLENK *et al.* en 1970 [6], de A. SHEID *et al.* en 1972 [16] ont même démontré la possibilité d'utiliser du tritium-glucosamine pour déterminer les glucoprotéines du Virus Sendai (VS 5), car ces isotopes possèdent une affinité spécifique pour les composants carbohydratés des sous-unités du virus.

C'est pourquoi nous avons décidé d'explorer la possibilité d'utiliser l'hydrochlorure de D- ( $^3\text{H}$ ) glucosamine pour déterminer les fractions glucoprotéiques du virus PI3. Cela a été effectué après concentration et purification de virion complet et après isolement des sous-unités glucoprotéiques des enveloppes du virus.

## MATERIEL ET METHODES

a) *Virus et culture de tissu.* Nous avons utilisé pour ces recherches le virus PI3 bovin, souche SD2, avec un titre  $\log \text{DL } 50 = 10^{-3,5}$  ( $\log = 10^{-3,5}/\text{DL } 50 \text{ } 0,1 \text{ ml}$ ) et un titre d'hémoagglutines de 1/64 (64 UHA/0,1 ml). La culture du virus a été faite sur la lignée cellulaire RBMD (cellules du rein de bovin - Madin Darby) en milieu DMEM

avec 2 % (v/v) de sérum fœtal de veau. Avant l'inoculation du virus, les cellules ont été cultivées en milieu DMEM à 10 % (v/v) de sérum de veau.

b) *Marquage du virus par les radioisotopes - concentration et purifications des virions.* Le virus PI3 (souche SD2) est inoculé sur lignée cellulaire RBMD développée dans deux boîtes de Roux (dimension  $27 \times 12,5$  cm). Avant l'inoculation du virus, les cellules sont lavées trois fois avec une solution physiologique (0,85 g ClNa/dl dans l'eau bidistillée). L'inoculation est réalisée avec 5 ml d'une suspension virale contenant 3 161 unités/0,1 ml. Après une période d'adsorption virale sur les cellules RBMD de 1,5 h à 35° C, nous ajoutons le milieu contenant le radioisotope d'hydrochlorure D - ( $6\text{-}^3\text{H}$ ) glucosamine (9,25 MBq, 250  $\mu\text{Ci}$ ), la concentration finale dans le milieu des lignées cellulaires inoculées étant de 2,5 Ci/ml.

Après 5 jours de culture, les lignées cellulaires infectées sont placées dans une glacière à  $-15^\circ\text{C}$  pendant 24 h ; puis, après décongélation, elles sont centrifugées à 3 500 t/m pendant 20 min ( $T\ 4^\circ\text{C}$ ), pour séparer le surnageant avec le virus. Le surnageant de l'une des boîtes est traité avec un volume identique de solution de sulfate d'ammonium pendant 30 min ( $T\ 4^\circ\text{C}$ ), tandis que le surnageant de l'autre boîte est traité avec 6,5 g/dl de PEG 6 000 (poly-éthylène-glycol - BDH - Chemicals Ltd Pool, Angleterre) en solution à 0,3 mol/l de chlorure de sodium, selon J. Mc SHARRY et R. BENZINGER en 1970 [10]. Le virus a été ainsi précipité et concentré.

Les deux précipitats sont alors sédimentés par centrifugation (3 500 t/m) pendant 30 min à  $+4^\circ\text{C}$ . Puis, chaque précipitat est brisé dans 1,5 ml de milieu DMEM contenant le double (v/v) de sérum fœtal de veau.

Les épreuves du virus concentré sont transférées à la surface de gradients de tartrate de sodium et potassium de 10 à 40 % (p/v) dans le tampon PBS 0,2 mol/l à pH 7,0, préparés 48 h à l'avance. Les gradients avec les épreuves du virus sont centrifugés (26 000 t/m) à  $+4^\circ\text{C}$  pendant 2 h jusqu'à équilibre.

Le virus dans les gradients est séparé sous forme de lignes bien visibles, qui sont repérables au centre de la colonne du gradient et au fond. L'existence d'une haute concentration de virus dans les lignes visibles et le dépôt est confirmé par hémagglutination et recherche de la radioactivité des épreuves. Les épreuves sont alors séparées, puis resuspendues dans le tampon PBS 0,2 mol/l à pH 7,0. Ensuite, par deux centrifugations successives (40 000 t/m) à  $+4^\circ\text{C}$ , le virus est sédimenté. Les épreuves du virus sont ainsi libérées de l'excédent de sel. Enfin, le surnageant est décanté et le dépôt de virus est resuspendu dans le tampon PBS 0,2 mol/l à pH 7,0 jusqu'au volume d'avant centrifugation. Le virus PI3 est finalement purifié par ce traitement.

c) *Destruction du virus avec le Triton X-100 et isolement des sous-unités glucoprotéiques.* Les épreuves du virus purifiées dans le tampon PBS 0,2 ml/l à pH 7,0 sont traitées avec 10 % (v/v) de Triton X-100 (acetyl-phenoxy-polyethoxyethanol, Sigma Chemical Comp.) pendant 25 min à + 20° C, puis centrifugés à 39 000 t/m pendant 1 h. Nous obtenons de la sorte les sous-unités glucoprotéiques dans le surnageant ; les nucléocapsides sont déposées au fond des tubes. La centrifugation du surnageant est continuée pour sédimenter les résidus de nucléocapsides.

Pour libérer les sous-unités glucoprotéiques du virus PI3 par le Triton X-100, nous avons utilisé la méthode d'incubation des épreuves dans l'Amberlite XAD - 2 à 20-50 mm (Serva) à + 20° C pendant 12-24 h, selon les modifications recommandées par P.S.J. CHEETHAM en 1979 [2] et C.A. KRUSE *et al.* en 1981 [7].

Finalement, les épreuves sont contrôlées pour la présence de radioactivité spécifique et pour le titre hémagglutinique.

d) *Hémagglutination des épreuves du virus*

Trois groupes d'épreuves sont contrôlés :

1. Les épreuves du virus dans les lignes visibles des gradients de tartrate de sodium et de potassium.
2. Les épreuves du virus purifié, recentrifugé dans le tampon PBS à pH 7,0.
3. Les épreuves des sous-unités glucoprotéiques.

Les contrôles sont effectués avec le test d'hémagglutination directe sur microplaques « Limbro », selon D.H. CLARKE et J. CASALS en 1958 [4], et B. МИХАЙЛОВИЧ en 1984 [11]. Nous utilisons une suspension à 0,5 % (v/v) d'hématies de cobaye ; la microtitration des antigènes est effectuée pour des dilutions de 1/4 à 1/4096 dans 0,1 ml de tampon PBS 0,2 mol/l à pH 7,0. Les résultats sont contrôlés après 2 h de séjour des épreuves à + 4° C.

e) *Détermination de la radioactivité spécifique*

Les épreuves précédemment mentionnées sont placées dans 10 ustensiles plastiques pour mesure de la radioactivité. Dans chaque ustensile, on verse 2 ou 3 ml d'épreuve sous un volume identique de liquide à scintillation ; dans deux autres ustensiles utilisés comme témoin, on verse seulement du tampon PBS sous un même volume de liquide à scintillation. Le liquide de scintillation est composé, pour 100 ml, de 35 ml de Triton X-100 pour scintillation technique (Serva) et 65 ml de toluol dans lequel on dissout 0,8 g de 2,5 diphényloxazole (DPO) et 0,02 g de 1,4-bis-2 (5 phényl) oxazolbenzène (BPOB), de telle sorte que la concentration finale dans les épreuves soit de 4 g/l de DPO et 0,1 g/l de BPOB (L. KAARIANEN *et al.*, 1969 [5]).

Après 12 h de séjour des épreuves à + 4° C, la radioactivité spécifique est mesurée à trois reprises avec l'appareil à scintillation Beckman LS-7000.

f) *Concentration des protéines*

Celle-ci est effectuée selon la méthode de O.H. LOWRY *et al.* en 1951 [8].

N.B. : La méthode de concentration du virus avec le PEG 6000 a été utilisée prioritairement et a été doublée par la mise en œuvre d'une méthode de concentration avec le sulfate d'ammonium (cf. supra).

## RESULTATS ET DISCUSSION

Les modifications, observées dans la radioactivité spécifique et dans le titre des hémagglutinines au cours du processus de concentration, purification et désintégration du virion PI3 marqué avec l'hydrochlorure D - (6-<sup>3</sup>H) glucosamine, sont traduites en résultats présentés dans les tableaux I et II.

Au cours du processus de purification du virus, pour les deux méthodes mentionnées, nous constatons une augmentation nette de la

Tableau I  
Résultats des mesures de radioactivité spécifique (cpm/ml)  
et concentration des protéines (mg/ml)

| A - méthode avec (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |           |        | B - méthode avec PEG-6000 |            |        |
|--|-----------|--------|---------------------------|------------|--------|
| 1  | 2         | 3      | 1                         | 2          | 3      |
| Ia.  | 22 981,32 | 0,1556 | Ib.                       | 359 984,63 | 0,3200 |
| IIa  | 9 206,25  | 0,2222 | IIb.                      | 81 571,45  | 0,3733 |

1. Nature de l'épreuve.
2. Radioactivité spécifique dans 1 ml de l'épreuve pour 1 min (cpm/ml).
3. Concentration des protéines (mg/ml).

Ia. - Ib. Virus des lignes visibles des gradients de tartrate de sodium et de potassium :

- Ia. Concentré avec le sulfate d'ammonium.
- Ib. Concentré avec le PEG 6000.

Après purification :

IIa. - IIb. Virus purifié et resuspendu dans PBS 0,2 mol/l à pH 7,0.

concentration en protéines (tab. I). La radioactivité spécifique est particulièrement bien visible dans les épreuves du virus des lignes de gradients : 22 981,31 cpm/ml pour la méthode au sulfate d'ammonium et 359 984,63 pour la méthode au PEG 6000.

Dans le deuxième procédé de purification : IIa - IIb, où les épreuves du virus libérées par les sel de sodium et de potassium sont resuspendues dans PBS 0,2 mol/l à pH 7,0, la radioactivité est un peu affaiblie (tab. I), quelle que soit la méthode de concentration (A ou B).

Tableau II  
Résultats des mesures de radioactivité spécifique (cmp/ml)  
et de titre des hémagglutinines (UHA/0,1 ml)

| A - méthode avec (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> |           |     | B - méthode avec PEG 6000 |       |
|--|-----------|-----|---------------------------|-------|
|  | 1         | 2   | 1                         | 2     |
| I  | 22 981,32 | -   | 359 984,63                | -     |
| II   | 9206,25   | 256 | 81571,45                  | 512   |
| III  | 22382,65  | 512 | 107 061,84                | 1 024 |
| IV   | 522,69    | -   | 616,65                    | -     |
| V  | 46,08     | 64  | 46,08                     | 64    |

1. Radioactivité spécifique dans 1 ml de l'épreuve pour 1 min (cmp/ml).

2. Titre des hémagglutinines (UHA/0,1 ml).

I. Virus concentré des lignes visibles des gradients après purification.

II. Virus purifié et resuspendu dans PBS 0,2 mol/l à pH 7,0.

III. Sous-unités glucoprotéiques.

IV. Nucléocapsides.

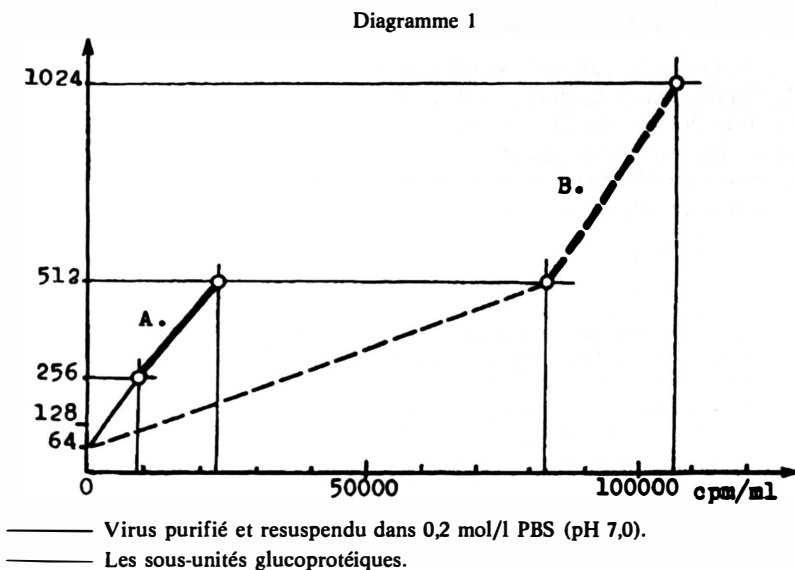
V. Témoin.

Si, dans le deuxième procédé de purification, la radioactivité est un peu affaiblie (cf. supra), les hémagglutinines au contraire sont en nette augmentation (II - tab. II) ; en effet, le titre passe de 64 à 265 UHA avec la méthode A ([NH<sub>4</sub>]<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>) et à 512 avec la méthode B (PEG 6000).

Après dégradation du virus avec 10 % (v/v) de Triton X-100 et séparation des sous-unités glucoprotéiques, nous constatons une augmentation de la radioactivité ainsi que du titre des hémagglutinines, par rapport

aux chiffres obtenus au stade immédiatement antérieur (III et II du tab. II) : 22 382,65 cpm/ml et 512 UHA/0,1 ml avec la méthode A, et 107 061,84 cpm/ml et 1 024 UHA/0,1 avec la méthode B.

Ces différentes données peuvent être schématisées sur le diagramme 1.



Les nucléocapsides libérées dans le sédiment par destruction des virions et resuspendues dans un même volume de tampon PBS à pH 7,0 démontrent une radioactivité minimale (IV - tab. II), ce qui peut être expliqué comme la conséquence de glucoprotéines résiduelles dans le sédiment.

La radioactivité spécifique des épreuves témoins est quasi-nulle.

## CONCLUSIONS

Les résultats obtenus permettent de tirer les conclusions suivantes :

1. Il existe une bonne corrélation entre les mesures de radioactivité spécifique du virus et les titres d'hémagglutinines constatés.

2. Dans le procédé de purification complété par une resuspension dans le PBS 0,2 mol/l, la radioactivité spécifique est un peu diminuée, alors que le titre des hémagglutinines est, lui, augmenté.

3. Lorsque l'isolement des sous-unités glycoprotéiques est réalisé, grâce à la désintégration du virus PI3, la radioactivité spécifique et le titre d'hémagglutinine sont notablement augmentés, ce qui confirme la présence d'une haute concentration en sous-unités glycoprotéiques, alors même que l'activité biologique a été complètement conservée.

4. Il est confirmé que l'utilisation du PEG 6000 pour concentrer le virus donne des résultats satisfaisants.

5. Grâce à l'affinité spécifique de l'hydrochlorure de D-(6-<sup>3</sup>H) glucosamine pour la partie carbohydratee glycoprotéique des antigènes du virus PI3, le procédé complet de concentration, purification et séparation des sous-unités glycoprotéiques des autres composants du virus, a été bien contrôlé. Cette maîtrise permet d'envisager une nouvelle expérimentation en vue de la mise au point d'un vaccin spécifique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRAKE (M.K.). — Density-gradient centrifugation. Academic Press, New York - London, 1967. *Methods in virology* edited by Karl Maramorosh and Hilary Kaprovski, vol. II, 93-117.
- [2] CHEETHAM (P.S.J.). — Removal of Triton X-100 from aqueous solution using amberlite XAD-2. *Analytical Biochemistry*, 1979, 92, 447-452.
- [3] CHEN (C.), COMPANS (R.W.), CHOPPIN (P.W.). — Parainfluenza virus surface projections : glycoproteins with hemagglutinin and neuraminidase activities. *J. Gen. Virol.*, 1971, II, 53-58.
- [4] CLARKE (D.H.), CASALS (J.). — Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 561-573.
- [5] KAARIANEN (L.), SIMONS (K.), von BONSDORFF (C.H.). — Studies in subviral components of Semliki Forest virus. *Ann. Med. Exp. Fen.*, 1969, 47, 235-248.
- [6] KLENK (H.D.), CALIGUIRI (L.A.), CHOPPIN (P.W.). — The proteins of the Parainfluenza virus SV5. II. The carbohydrate content and glycoproteins of the virion. *Virology*, 1970, 42, 473-481.
- [7] KRUSE (C.A.), SPECTOR (E.B.), CEDERBAUM (S.D.), WISNIESKI (B.J.). — Microinjection of arginase into enzymedeficient cells with the isolated glycoproteins of Senda virus as Fusogen. *Biochim. and Biophys. Acta*, 1981, 645, 339-345.
- [8] LOWRY (O.H.), ROSEBROUGH (N.J.), FARR (A.L.), RANDALL (R.J.). — Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 1951, 193, 265-275.
- [9] LUUKKONEN (A.), GAHMBERG (C.G.), RENKONEN (O.). — Surface labeling of Semliki Forest virus glycoproteins using galactose-oxidase. *Virology*, 1977, 76, 55-59.
- [10] Mc SHARRY (J.), BENZINGER (R.). — « Short communications ». Concentration and purification of vesicular stomatitis virus by polyethylene-glycol « precipitation ». *Virology*, 1970, 40, 745-779.
- [11] MIHAJLOVIC (B.). — Prirucnik za laboratorijsku dijagnostiku, 1984, 363-375.
- [12] MOREIN (B.), SHARP (M.), SUNDQUIST (B.), SIMONS (K.). — Protein subunit vaccines of Parainfluenza type 3 virus : immunogenic effect in lambs and mice. *J. Gen. Virol.*, 1983, 64, 1557-1569.



- 
- [13] MOUNTCASTLE (W.E.), COMPANS (R.W.), CHOPPIN (P.W.). — Proteins and glycoproteins of paramixoviruses : a comparison of Simian virus 5, Newcastle disease virus, and Sendai virus. *Journal of Virology*, 1971, 7, 1, 47-52.
- [14] PANIGRAHI (P.), MOHANTY (S.B.), MAHESWARI (R.K.), FRIEDMAN (R.M.). — Structural proteins of bovine Parainfluenza virus. *Veterinary Microbiology*, 1987, 13, 205-210.
- [15] SCHEID (A.), CHOPPIN (P.W.). — Identification of biological activities of paramixovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology*, 1974, 57, 475-490.
- [16] SCHEID (A.), CALIGUIRI (L.A.), COMPANS (R.W.), CHOPPIN (P.W.). — Isolation of paramixovirus glycoproteins. Association with the Larger SV5 glycoprotein. *Virology*, 1972, 50, 640-652.
- [17] SCHLESINGER (M.J.), SCHLESINGER (S.). — Domains of virus glycoproteins. *Advances in virus research*, 1987, 33, 1-44.
- [18] THOMPSON (S.D.), LAVER (W.G.), MURTI (K.G.), PORTNER (A.). — Isolation of a biologically active soluble form of the hemagglutinin - neuraminidase protein of Sendai virus. *Journal of Virology*, 1988, 62, 12, 4563-4660.
- [19] WECHSLER (S.L.), LAMBERT (D.M.), GALINSKI (M.S.), HEINEKE (B.E.), PONS (M.W.). — Human Parainfluenza virus 3 and characterization of subviral components, viral proteins and viral RNA. *Virus Research*, 1985, 3, 339-351.
-