

ETUDE ULTRASTRUCTURALE DE L'ORGANISATION DU NUCLÉOÏDE DU VIRUS DE LA VARICELLE ET DU ZONA

S. SCHOONBROODT, J. PIETTE et B. RENTIER
Secteur de Virologie, Département de Microbiologie, B23 Sart-Tilman
Université de Liège, B-4000 Liège (Belgique)

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE ORGANIZATION OF VARICELLA-ZOSTER VIRUS NUCLEOID

ABSTRACT: Varicella-Zoster Virus belongs to the α -Herpesvirus family. The morphological characteristics of this group are a central core made of DNA and proteins, an icosahedral capsid, a granular material called tegument and an envelope.

The aim of this work was to determine the conditions under which virus morphology appears best preserved.

The preparation conditions have been optimized using a panel of fixing agents and dehydratants. We have demonstrated that methanol, DMSO and ethanol / methanol allowed a better preservation of the viral particles and could be determinant for the appearance of the core. Methanol appears as the best because it permits the observation of more complex internal VZV nucleoid organization.

KEY WORDS: Electron microscopy; virus morphology.

INTRODUCTION

La classification des Herpesviridae, définis par Andrewes (1964), a initialement été réalisée sur base de considérations morphologiques. C'est généralement le virus de l'Herpes Simplex (HSV) qui est pris comme modèle de cette famille.

Le virion est principalement constitué de 3 éléments architecturaux : un nucléoïde, une capsidie et une enveloppe.

Le nucléoïde est une structure toroïdale longue de 75 nm et de forte densité électronique. DNA bicaténaire linéaire et protéines en sont les constituants majeurs.

Chaque nucléocapsidie est composée de 162 capsomères hexagonaux et pentagonaux assemblés en une structure icosaédrique d'approximativement 100 nm de diamètre. Un matériel granulaire de nature protéique, appelé tégment, est observé en périphérie. L'ensemble est entouré d'une

Présenté le 17 octobre 1991

enveloppe lipoprotéique acquise vraisemblablement lors du bourgeonnement du virion à la membrane nucléaire interne des cellules hôtes. Cette enveloppe virale contient des projections glycoprotéiques superficielles radiales de 8 nm. La particule virale intacte a un diamètre de 180 à 200 nm.

Sur base de ces caractéristiques ultrastructurales, le virus de la varicelle et du zona fut classé dans cette famille (Tournier et al., 1957).

Cependant, malgré l'importance de la maladie engendrée par ce dernier, notamment dans sa manifestation secondaire, le zona, les recherches et observations sur ce virus sont restées peu nombreuses et extrêmement délicates à réaliser. En effet, alors qu'*in vivo*, le virus est libéré en grande quantité dans les vésicules cutanées, *in vitro*, il est malaisé à cultiver, ne se réplique que dans un spectre d'hôtes très restreint, reste associé aux cellules qu'il infecte et est particulièrement instable en milieu extracellulaire (Yamanishi et al., 1980 ; Shiraki et Takahashi, 1982). L'étude du VZV, de son cycle infectieux, de sa structure et de sa composition est, en cela, rendue très difficile. Ainsi, par exemple, l'infection de cultures cellulaires n'est généralement possible que par co-culture, impliquant notamment de nombreux problèmes de synchronisation de l'infection et compliquant, par là même, l'étude des stades précoces du cycle du VZV.

Ces difficultés sont partiellement responsables du peu de connaissance dont nous disposons concernant ce virus.

D'autre part et pour les raisons inverses, une riche documentation sur HSV est disponible depuis longtemps. Ainsi, par exemple, Furlong et al.(1972) ont disserté sur l'arrangement du DNA de HSV dans la capsid.

Néanmoins, lorsque l'on considère l'ensemble des données, il apparaît que la structure fine des virus est un sujet assez peu exploité par les auteurs. Dans la perspective de combler ce manque d'informations, nous avons choisi d'examiner en détail la morphologie du VZV et de déterminer les conditions où l'ultrastructure du virus est observable avec le plus de détails. Nous discuterons également sa relation structurale avec HSV.

MATERIELS ET METHODES

TYPE CELLULAIRE ET VIRUS : La souche cellulaire est la lignée continue VERO ("African Green Monkey strain"). Les cultures en monocouches croissent dans du milieu 199 complété avec 10% de sérum foetal de boeuf.

La souche du VZV utilisée a été isolée par aspiration stérile au niveau de lésions vésiculaires d'un patient. Elle montre le profil de restriction de la souche Ellen (Straus et al., 1981).

Tous les produits nécessaires à la mise en culture proviennent des laboratoires GIBCO, Grand Island, NY (USA).

PROCEDURE D'INFECTION : Le virus est mis en culture par dépôt du prélèvement sur une monocouche cellulaire. Afin de réaliser le passage du virus, un inoculum de cellules infectées traitées par la trypsine (0,1 M, pendant 5 min.) est mis en présence d'une culture de cellules saines également traitées par la trypsine (principe de la co-culture). Les cellules infectées par le VZV sont fixées 72 h après l'infection.

FIXATION ET PROCEDURES D'ENCHASSEMENT : La préparation du matériel pour la microscopie électronique a été réalisée comme suit : Les cultures infectées sont récupérées par grattage des boîtes de culture au moyen d'un racloir ou par traitement par la trypsine. Les cellules sont ensuite soumises à une centrifugation à faible vitesse (1.500 rpm) pendant 10 min. Le culot cellulaire, réduit en petits fragments, est mis en présence des différents fixateurs cités ci-dessous. Après la fixation, les cellules sont lavées 3x10 min dans un tampon cacodylate ((CH₃)₂As O₂Na .3H₂O, 0,1M, pH 7,2) à température ambiante. Un traitement par le tétr oxyde d'osmium (2% dans du tampon cacodylate) est ensuite réalisé pendant 30 min à 20°C. Les cellules sont rincées 3x10 min avec de l'eau distillée, déshydratées dans des solutions de proportion croissante en alcools (20°C) puis finalement mises en présence de deux bains successifs d'époxy-propane pendant 10 min. La résine utilisée est l'Epon 812 (Fluka Chemie AG, Buchs, Suisse). Les coupes ultrafines sont contrastées par l'acétate d'uranyle et par le citrate de plomb et sont examinées dans un microscope électronique JEOL 100 CX II.

Afin d'améliorer l'analyse morphologique du VZV, nous avons choisi de faire varier les différents procédés de préparation du matériel comme suit :

1. Trois agents fixateurs furent sélectionnés, à savoir le glutaraldéhyde (2,5%) utilisé pendant 30 min à 20°C, une combinaison de formaldéhyde (4%) et de glutaraldéhyde (0,1%) pendant 30 min à 20°C ou l'acroléine (10%) pendant 1 h à 20°C.
2. Une post-fixation au tétr oxyde d'osmium (2%) fut réalisée après chaque type de fixation.
3. Plusieurs types de déshydratants ont été testés :
 - Ethanol (70-95-100%)
 - Méthanol (30-50-70-100%)
 - Acétone (25-50-75-100%)
 - Diméthylformamide (30-50-70-100%)
 - DMSO (30-50-70-100%)
 - Isopropanol (30-50-70-100%)

Nous utilisons également la combinaison de deux déshydratants : une déshydratation par l'éthanol (30-70%) complétée par une déshydratation par le méthanol (70-100%) ou la séquence inverse.

4. L'époxy-propane a été également utilisé après chaque type de déshydratation afin d'éviter tout problème de compatibilité entre résine et solvant.

RESULTATS

Les procédés d'infection utilisés permettent d'obtenir une grande quantité de particules virales sous forme de nucléocapsides intranucléaires ou de virions cytoplasmiques matures.

Pour déterminer la technique permettant l'obtention des images les plus détaillées de la structure virale, nous avons choisi de faire varier deux éléments: le fixateur et le déshydratant.

1. L'analyse systématique des différentes combinaisons de ces deux paramètres montre que c'est l'action de l'agent déshydratant qui est prépondérante.

* Après application de la technique classique de cytologie ultrastructurale, comprenant une déshydratation par l'éthanol, la particule virale, en milieu extracellulaire, présente l'aspect suivant (Fig. 1a):

Le nucléoïde a généralement l'apparence d'une masse très dense et il est également possible de l'observer dans sa conformation si souvent décrite dans la littérature, le tore (Fig. 1b). Autour de lui s'organise une capsidite à section plus ou moins hexagonale. Une zone de même densité électronique que l'espace externe fait suite à la capsidite et contient des fibres de matériel. Le tégument a l'aspect d'un matériel granulaire. Cet ensemble est entouré d'une enveloppe virale, où les deux feuillets de la bicouche lipidique membranaire, conservés grâce à la postfixation à l'osmium, sont visibles. Celle-ci est ornée d'un matériel fibreux, les glycoprotéines de surface.

* Après déshydratation, que ce soit par le méthanol, le diméthylformamide, le diméthylsulfoxyde ou l'éthanol combiné au méthanol, seul l'aspect du nucléoïde semble modifié par rapport à la morphologie de référence. Celui-ci se présente alors sous forme d'un cylindre composé d'épais filaments juxtaposés (Fig. 2).

Dans le cas du méthanol seul ou de l'éthanol complété par le méthanol, nous observons des détails particuliers (Fig. 3 a et b):

Le nucléoïde paraît entouré d'une "cage" de matériel de même densité électronique que le cylindre central, bordant l'intérieur de la capsidite. Des striations de matériel reliant cette cage au corps central peuvent être visualisées.

Assez curieusement, une déshydratation par le méthanol complétée par une déshydratation par l'éthanol ne donne pas le même résultat. Les nucléoprotéines présentent à nouveau fréquemment la conformation en tore, la cage de matériel ainsi que les striations ont disparu (Fig. 4).

La Fig. 5 résume les observations réalisées au niveau du nucléoïde après les différents traitements.

Fig. 5: Effets des déshydratants sur l'organisation du DNA encapsidé du VZV

	Glutaraldéhyde	F/G	Acroléine
Ethanol	T	T	T
Méthanol	C S Cyl	C S Cyl	C S Cyl
Acétone	FI	FI	FI
Diméthylformamide	Cyl MA	Cyl MA	C MA Cyl
Diméthylsulfoxyde	C MA Cyl	C MA Cyl	C MA Cyl
Isopropanol	FI	FI	FI
Ethanol --> Méthanol	C MA Cyl	C MA Cyl	C Cyl
Méthanol --> Ethanol	T	FI	T

T=Tore; C=cage; S=striations; Cyl.=cylindre; FI=forme irrégulière; MA=matériel amorphe

2. Un des principaux rôles de la fixation est de préserver la structure cellulaire dans la conformation la plus proche du vivant. Les trois agents de fixation utilisés remplissent cette condition car la morphologie générale des cellules infectées est bien conservée: les deux feuilletts membranaires, les citernes du REG, les saccules du Golgi, l'enveloppe nucléaire se distinguent parfaitement. Nous avons montré le rôle prépondérant des déshydratants dans notre analyse, cependant nous remarquons que, pour un déshydratant, l'isopropanol, la morphologie générale de la particule est améliorée lorsque le fixateur est le glutaraldéhyde (Fig.6).

Rappelons-nous que le VZV est un virus restant associé aux cellules qu'il infecte. Il est donc relativement rare d'observer des particules virales complètes dans le milieu extracellulaire; celles-ci présentent très souvent une enveloppe incomplète.

Il apparaît que les nucléocapsides non-enveloppées et les virions complets subissent des modifications structurales identiques en réponse aux différents procédés utilisés.

Nous constatons également que, dans certains herpesvirions, le tore apparaît suspendu à la capside par de fins spicules d'aspect fibreux, dans d'autres, on peut observer un matériel très fin d'aspect granulaire. (L'opacité de ce matériel, sous le faisceau d'électrons varie d'ailleurs considérablement d'un virion à un autre)

DISCUSSION

Nos recherches ont été guidées par un souci d'obtention des meilleures données morphologiques pour le VZV. Pour ce faire, trois fixateurs couplés à huit agents déshydratants ont été testés. Quel que soit le fixateur ou le déshydratant utilisé, nous observons que la morphologie des particules est bien préservée. Cependant une analyse plus approfondie des images obtenues nous indique des variations dans l'organisation structurale du corps central du VZV.

Nous démontrons que l'agent déshydratant est le facteur critique principal déterminant la configuration des nucléoprotéines encapsidées. Ces résultats nous ont amené à discuter plus particulièrement cet aspect de nos observations.

En effet, lorsque nous analysons nos résultats, nous constatons que seule la technique classique de microscopie électronique permet d'observer le nucléoïde du VZV en forme de tore, structure décrite maintes fois chez les Herpesviridae (Heine, 1974; Nazerian, 1974; Furlong et al., 1972; Chai, 1971) et désormais admise par les différents auteurs.

Par contre, l'utilisation d'une gamme d'autres déshydratants nous permet d'observer des variations dans cette conformation (Fig. 1).

A la vue de ce tableau, trois déshydratants nous paraissent intéressants. En effet, le méthanol, le DMSO et l'éthanol / méthanol nous permettent d'obtenir plus de détails quant à l'ultrastructure de la nucléoprotéine.

Après déshydratation par ces agents, la configuration de la nucléoprotéine est, en effet, différente: une organisation plus complexe apparaît: le corps central, constitué d'épais filaments, apparaît cylindrique, des stries de matériel le relient à une "cage" externe de matériel bordant l'intérieur de la capsid. Cependant, dans le cas du DMSO et de l'éthanol couplé au méthanol, les striations sont moins fréquemment observées. Nous décidons donc d'axer cette partie de la discussion sur le méthanol car nous pensons qu'il est le meilleur agent déshydratant de la série testée. Nous ne devons cependant pas écarter la possibilité que ces détails supplémentaires puissent être le résultat de phénomènes artéfactuels bien que notre critère de référence, en l'occurrence le support cellulaire nécessaire à l'infection soit bien conservé après les différents traitements. Le méthanol a d'ailleurs été considéré par Bahr et al. (1957) comme un déshydratant donnant de meilleurs résultats que l'éthanol.

Nous voyons donc deux principaux types d'organisation, l'un où le nucléoïde, en forme de tore, est seul à l'intérieur de la capsid et l'autre où le corps central est en relation avec une "cage" de matériel de même densité électronique entourant ce dernier. Nos observations confirment ainsi celles réalisées précédemment sur HSV. Nous pensons que ces deux types de configurations correspondraient à deux états de compaction du nucléoïde.

Cette hypothèse a déjà été soulevée par l'équipe de Puvion-Dutilleul (1985, 1987) qui a observé ce même type d'organisation complexe pour un autre membre des Herpesviridae, HSV. Dans une première étude, Puvion-Dutilleul et al. (1985) montraient l'importance du milieu d'enclassement pour ce phénomène. Ayant poursuivi leur étude, ils conclurent finalement à la prépondérance du déshydratant (1987).

Dans chaque cas, nous remarquons que le degré de condensation du nucléoïde est beaucoup plus intense après l'éthanol qu'après le méthanol, ce qui laisse penser, d'une part, que la fixation ne permettrait pas d'immobiliser totalement et définitivement le matériel traité et, d'autre part, que les propriétés des alcools interviendraient dans la compaction du corps central de la capsid. Nous pensons que le méthanol, plus petite molécule que l'éthanol, pénétrerait plus rapidement dans le matériel cellulaire et figerait, ainsi, les différents constituants du nucléoïde dans leur conformation originale. La déshydratation par l'éthanol induirait une compaction plus grande et peut-être même trop grande du nucléoïde, masquant ainsi le véritable arrangement du DNA viral dans la capsid. C'est pourquoi nous pensons que le méthanol est le meilleur déshydratant car il révélerait mieux l'organisation interne de la nucléoprotéine.

Puvion-Dutilleul et al. (1987) expliquent ce phénomène par la présence de spermine. Celle-ci a été décelée par Gibson et Roizman (1971) chez les Herpesvirus et interviendrait, selon Spear et Roizman (1980), dans la condensation du DNA. Dès lors, ils pensent que la rétention de cette molécule dans le matériel traité par l'éthanol provoquerait une plus grande compaction du DNA.

Dans le même ordre d'idée, nous montrons que le phénomène de déshydratation est réversible car, lorsque nous combinons deux déshydratants dans un même traitement, c'est toujours le dernier qui détermine l'organisation finale du nucléoïde.

Nous avons attiré l'attention, dans les résultats, sur le fait que l'ultrastructure générale du virus, dans le cas d'une déshydratation par l'isopropanol, semblait améliorée lorsque l'on utilise le glutaraldéhyde comme fixateur. Cela laisserait supposer que celui-ci intervient dans la restitution de la meilleure morphologie du virus.

La figure 3 nous montre les épais filaments du nucléoïde. Ces derniers apparaissent, en coupe, disposés parallèlement les uns par rapport aux autres. De plus, l'on n'observe jamais de cylindre présentant une lumière centrale. La nucléoprotéine du VZV s'agencerait, selon nous, en un solénoïde plein.

Néanmoins, tant que nous ne disposons pas de plus d'informations concernant l'état moléculaire des systèmes subissant les techniques de préparation pour la microscopie électronique, il est presque impossible de se prononcer définitivement quant à la structure du corps central. L'application de méthodes comme la cryofixation pourrait fournir, peut-être, des renseignements supplémentaires.

Nous concluons donc notre étude de la morphologie du VZV par les résultats intéressants obtenus en utilisant le méthanol comme agent déshydratant, cette technique peut d'ailleurs s'appliquer à l'étude de l'ensemble des Herpesviridae et sans doute être généralisée à tous les virus à DNA enveloppés.

Remerciements: Je tiens tout particulièrement à remercier le Dr M. Thiry pour ses nombreux conseils et discussions, Melle F. Skivée pour son aide technique lors de la réalisation de ce travail, le Prof. G. Goessens ainsi que S. Debrus et toute "l'équipe" présente au laboratoire.

REFERENCES

- Almeida, J.D., A.F.Howatson et M.G.Williams (1962). *Virology*, 16 : 353.
- Andrewes (1964). In "Viruses of Vertebrates", pp 211-212. Baillière, London.
- Bahr, G.F, G. Bloom, U. Friberg (1957). *Exp. Cell Res.*, 12 : 342.
- Chai L (1971). *Proc. Am. Assn. Cancer Res.*, 12 : 18.
- Furlong D., H. Swift et B. Roizman (1972). *J. Virol.*, 10 : 1071.
- Gibson W.et R.Roizman (1971). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68 : 2818.
- Hayat , M.A.(1981). New York, Academic Press.
- Heine U.I. (1974). In Busch H, ed. *The cell nucleus*. New York, Academic Press, 3 : 489.
- Langenberg W.G., R.L. Sharpe (1978). *J. Gen. Virol.*, 39 :377.
- Nazerian K. (1974). *J. Virol.*, 13 : 1148.
- Puvion-Dutilleul, F., E. Pichard et E.H. Leduc (1985). *Biol. Cell*, 54 : 195.
- Puvion-Dutilleul, F., E. Pichard, M. Laithier et E.H. Leduc (1987). *J. Histochem. Cytochem.*, 35 : 635.
- Shiraki, K., et M. Takahashi (1982). *J. Gen. Virol.*, 61 : 271-275.
- Spear, P.G. et B Roizman (1980). In Tooze J., ed. *DNA tumor viruses*. 2è ed. Cold Spring Harbor Monograph, 615.
- Straus S.E., H.S. Aulack, W.T. Ruychan, J. Hay, T.A. Casey, G.F.VanDeWoude, J. Owens et H.A. Smith (1981). *J. Virol.*, 40 : 516-525.
- Tournier, P., F. Cathala et W.Bernhard (1957). *Presse médicale*, 65 : 1229.
- Yamanishi, H., Y. Matsunaga, T. Ogino, M. Takahashi et A. Takamizowa (1980). *Infect. Immun.*, 28 : 536-540.

Fig.1a: Morphologie du Varicella-Zoster Virus après application de la technique classique de préparation du matériel en ultrastructure. (x 83 000).

Fig.1b: Observation du tore. (x 70 000).

Fig. 2: VZV après déshydratation par le diméthylsulfoxyde. Flèche: filaments épais. (x 83 000)



Fig. 3a: Effet d'une déshydratation par le méthanol (x 133 000). La cage de matériel est délimitée par deux pointes de flèches.

PLANCHE 1

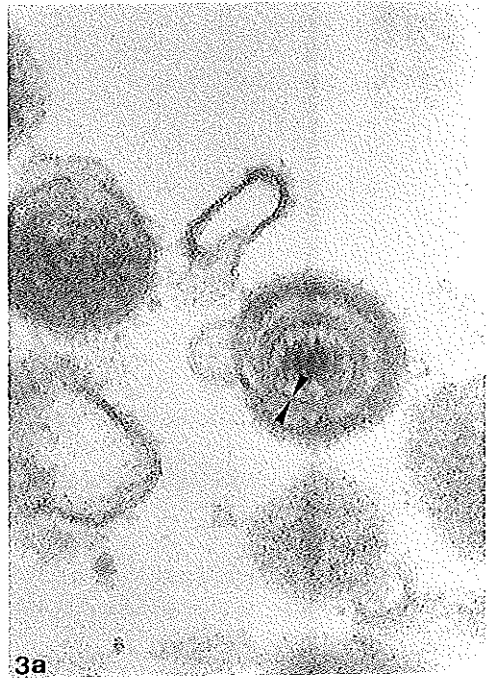
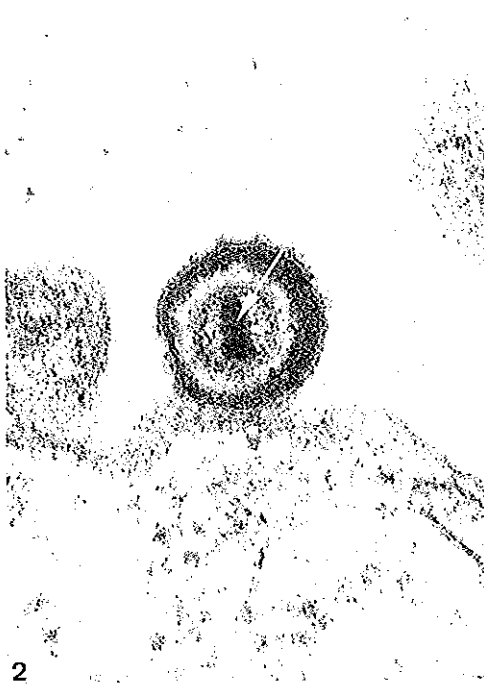
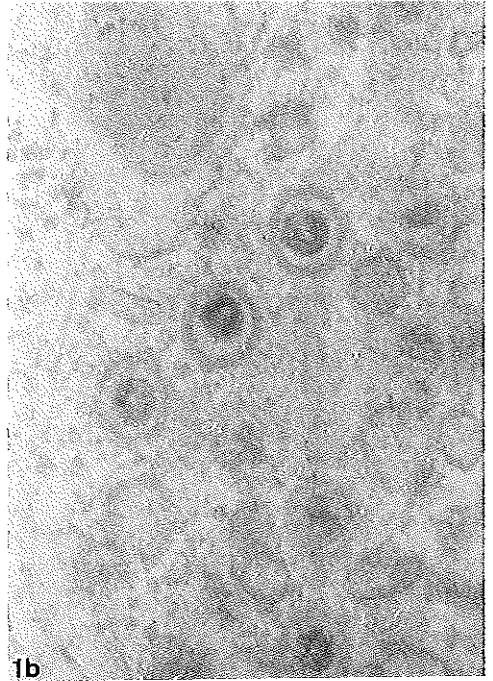
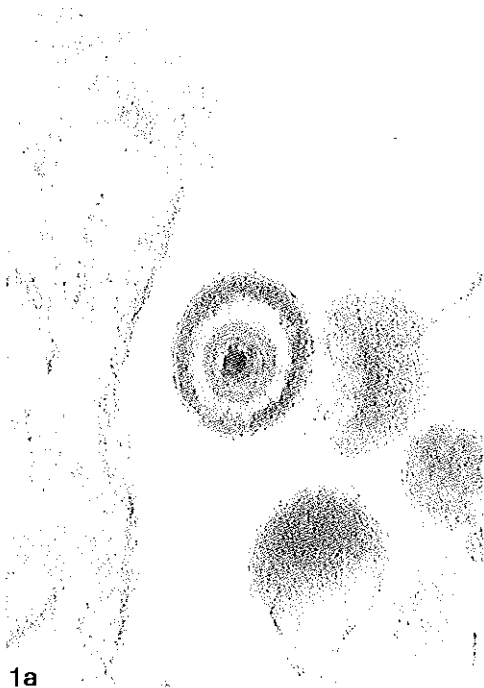


Fig. 3b: Effet d'une déshydratation par l'éthanol conjugué au méthanol (x 116 600).
La cage de matériel est délimitée par deux pointes de flèches.

Fig. 4: Observation d'une particule virale après déshydratation par méthanol/éthanol (x 93 000).



Fig. 6: Varicella-Zoster Virus après déshydratation par l'isopropanol.
(a) fixation: Acroléine-Osmium.(x 100 000) (b) fixation:Glutaraldéhyde-Osmium.
(x 83 000)

PLANCHE 2

