

## SÉPARATION ET ANALYSE DES PROTÉINES DU VIRUS DE LA FIÈVRE APHTEUSE

J. LAPORTE

*Station de Virologie et d'Immunologie, 78 - Thiverval-Grignon  
Institut national de la Recherche agronomique*

---

### RÉSUMÉ

L'analyse et la séparation des protéines de la capsidite d'un mutant du type O du virus de la fièvre aphteuse sont effectuées selon deux techniques différentes : détermination des acides aminés  $\text{NH}_2$  terminaux et électrophorèse en gels de polyacrylamide des protéines virales dénaturées par l'urée et les pH alcalins ou par les détergents en milieu dissociant et réducteur.

La dansylation des groupes  $\text{NH}_2$  terminaux permet la mise en évidence de 3 peptides différents dont deux sont plus étroitement liés à l'acide ribonucléique viral. L'électrophorèse confirme que la capsidite du virus de la fièvre aphteuse est composée de cinq peptides qui sont identifiés parmi les protéines spécifiques synthétisées au cours du cycle viral.

---

### INTRODUCTION :

#### RAPPELS SUR LA SÉPARATION ET L'ANALYSE DES PROTÉINES VIRALES

Après les travaux de LWOFF sur le virus de la poliomyélite (1961), PRUNET (1964), puis ASSO *et al.* (1966 *a*) ont pu établir une relation entre le pouvoir pathogène du virus de la fièvre aphteuse et la thermosensibilité de sa multiplication en culture cellulaire (*vt*). Cependant, ayant obtenu des mutants froids pathogènes, ASSO *et al.* (1966 *b-c*) ont mis en évidence un autre composant du pouvoir pathogène : la stabilité du virion dans le milieu extérieur permettant une diffusion plus ou moins efficace. Cette stabilité essentiellement due à la structure de la capsidite protéique du virus est décelée par la sensibilité de l'infectiosité à la chaleur et au pH.

C'est pourquoi nous avons entrepris des études chimiques afin d'étudier la structure protéique du virus de la fièvre aphteuse et de comparer ainsi les différents mutants.

Nous allons tout d'abord faire un bref rappel des techniques de séparation et d'analyse des protéines virales afin de justifier celles que nous avons utilisées.

Les capsides (non lipoprotéiques) des virus sont en général composées d'agrégats d'un ou plusieurs polypeptides réunis par des liaisons secondaires. Ces sous-unités sont liées de la même manière à l'acide nucléique. Parmi ces liaisons, les plus importantes sont les liaisons hydrophobes puis les liaisons hydrogènes, les liaisons de Van der Waals, les liaisons ioniques, les chélates et les ponts disulfures. Toutes les conditions ou les agents capables de les rompre permettront d'obtenir une séparation plus ou moins complète des constituants viraux. Les protéines seront natives ou dénaturées. Notons aussi que certaines infections virales conduisent à la synthèse de capsides dépourvues d'acide nucléique, de taille identique à celle du virus complet. Ces capsides étant peut-être incomplètes il est toujours nécessaire de préparer les protéines virales à partir de virus infectieux purifiés. Des méthodes physiques et chimiques sont utilisables : la chaleur (5 mn à 100°C) inactive la plupart des virus et conduit à la précipitation de protéines amorphes. Ce sont cependant les traitements chimiques qui sont les plus utilisés. A pH alcalin, 10-12, l'ionisation de nombreux groupes aminés des protéines virales est supprimée. On obtient soit des monomères, soit des agrégats dissociables par les détergents (à + 40°C les résultats sont meilleurs — BOEYF, 1967). Le traitement acide le plus utilisé est celui par l'acide acétique à 67 p. 100 (FRAENKEL-CONRAT, 1957) : l'acide nucléique précipite, les protéines restent en solution. Les détergents aussi sont capables de dissocier un grand nombre de virus ; le plus utilisé est le dodécyl sulfate de sodium (S. D. S.). Les réactifs neutres (urée 8 M, guanidine 6 M) ont une action mal connue et souvent incomplète, peut-être au niveau des liaisons hydrogènes.

Lorsque les protéines virales sont isolées il faut les analyser. C'est un problème difficile car on ne dispose fréquemment que de très peu de matériel et de plus, les protéines virales ont fortement tendance à s'agréger. Ceci a donc conduit à mettre en œuvre plus particulièrement certaines méthodes d'analyse.

Nous ne ferons qu'évoquer l'ultracentrifugation qui permet de déterminer la densité, le coefficient de sédimentation, la masse de protéines en suspension, mais qui nécessite pour être analytique quelques milligrammes de la substance.

Par contre, l'électrophorèse, et plus particulièrement celle pratiquée en gels de polyacrylamide, a permis d'obtenir des résultats importants. Très sensible puisqu'elle peut s'adresser à du matériel marqué par des isotopes radioactifs, elle est basée sur une séparation due à la charge et à la masse moléculaire. Ces gels sont faciles à préparer, reproductibles et se forment même en présence d'une quantité importante de dénaturant (S. D. S., urée). Cette technique est difficilement préparative. A ce propos il faut citer les remarquables travaux de MAIZEL (1963), SUMMERS et MAIZEL (1968), JACOBSON et BALTIMORE (1968), concernant les protéines de structure du virus de la poliomyélite et la biosynthèse des protéines au cours du cycle de ce virus.

Des méthodes chimiques sont aussi envisageables. Il s'agit tout d'abord de la composition globale en acides aminés qui est maintenant automatisée ; la sensibilité atteint ici la nanomole ( $10^{-9}$  mole).

On peut également effectuer l'étude des acides aminés terminaux qui possèdent soit leur fonction amine soit leur fonction acide libre donc réactive. Dans le cas des virus, les groupes N-terminaux sont parfois acylés. S'ils sont libres une technique très sensible (nanomole) permet de déterminer l'acide aminé terminal, c'est la dan-

sylation dont nous verrons un exemple au cours de cet exposé. L'analyse de la séquence en acides aminés basée sur des clivages spécifiques des grandes molécules puis sur l'analyse récurrente des fragments s'adresse à des protéines relativement abondantes.

Lorsque nous avons commencé notre étude des protéines du virus de la fièvre aphteuse nous ne disposions que de faibles quantités de virus purifié, c'est pourquoi nous avons utilisé les techniques les plus sensibles : étude chimique à l'aide de la dansylation, étude physique à l'aide de l'électrophorèse en gel de polyacrylamide de matériel radioactif.

## I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. — Dansylation

#### *Virus et cellules.*

Le virus utilisé est de type O, mutant du groupe I défini par ASSO (1967), inactivé par chauffage à 55°, mais résistant à 50°.

Il est produit sur couches monocellulaires de B. H. K. 21, clone 13 (MAC PHERSON ET STOCKER, 1962) en bouteilles roulantes de 1 litre ou bien en suspension de B. H. K. S 13 (BOUË) en fermenteur de 20 litres (Bio-Laffite).

Les titrages sont effectués par la méthode des plages sur cellules de rein de porc (HAAG, 1962) en tubes de Leighton.

#### *Purification du virus (en cours de publication).*

Toute la purification est effectuée à + 4°C, en tampon *Tris*-HCl 0,16 M, pH 7,6, 1 p. 100 EDTA (Tampon A) après précipitation par le polyéthylène-glycol (10 p. 100). Elle comporte tout d'abord une chromatographie sur Sepharose 2 B (Pharmacia) puis une ultracentrifugation sur gradient constant de densité de saccharose de 15 à 45 p. 100 dans le rotor SW 25 d'une ultracentrifugeuse Spinco L.2 65 B à 24 000 tours/mn pendant 3 heures 30. Le pic infectieux est dialysé contre l'eau distillée pendant 48 heures puis lyophilisé.

#### *Préparation des protéines virales.*

Le virus purifié est dissous dans du tampon *Tris*-HCl 0,02 M pH 8,6 et ajusté à 8 M urée, ou bien porté à pH 10,5 par la soude, et 8 M urée pendant 16 heures à + 40°C (BOEYE, 1967). La séparation des produits de la réaction se fait par chromatographie sur échangeur d'anions (Sephadex A 25) dans le tampon précédent. L'élution s'effectue à l'aide d'un gradient de chlorure de sodium de 0 à 1 M.

#### *Détermination des acides aminés N-terminaux.*

Les peptides dialysés contre l'eau distillée sont dansylés à l'aide du chlorure de dansyle (1-diméthyl amino naphthalène 5-sulfonyl) (GRAY, 1967) qui réagit avec les NH<sub>2</sub> libres. Après hydrolyse du produit dansylé par HCl 6 N pendant 16 heures à 100°, l'identification des résidus est faite par chromatographie bi-dimensionnelle en couche mince sur gel de silice ou papier de polyamide. Le solvant de la première dimension est l'acide formique à 1,5 p. 100 dans l'eau, celui de la deuxième dimension est un mélange de *n*-butanol, *n*-heptane, acide acétique glacial, dans les proportions suivantes en volume : 6/6/2.

### B. — Gels de polyacrylamide

#### *Préparation du matériel radioactif.*

Le virus est produit en cycle unique (20 u. f. p./cellule) à partir de  $1 \times 10^8$  cellules B. H. K. 21, S 13 en suspension. Ces cellules sont d'abord placées dans du milieu salin de Earle donc sans acides aminés pendant 1 heure. Elles sont ensuite infectées en présence d'actinomycine D (M. S. D.)

à 5  $\mu\text{g/ml}$ . Après une demi-heure d'adsorption à  $+ 36^{\circ}\text{C}$ , les cellules sont lavées par le milieu salin et centrifugées, puis remises en suspension à raison de  $5 \times 10^8/\text{ml}$  dans 40 ml de ce milieu salin. 1 heure 30 après le début du cycle on ajoute soit 5  $\mu\text{Ci/ml}$  d'hydrolysats de chlorelles  $^{14}\text{C}$  (préparation des protéines de structure du virus), soit 5  $\mu\text{Ci/ml}$  d'un mélange en parties égales de Leu  $^3\text{H}$  et de Val  $^3\text{H}$  (préparation des protéines synthétisées au cours du cycle viral). A la fin de la phase linéaire de multiplication (4 heures 30 après le début du cycle), les cellules sont centrifugées, reprises dans 1 ml de tampon A, puis congelées et décongelées 3 fois dans un mélange alcool-carboglace. Le surnageant  $\text{S}_1$ , obtenu après centrifugation, a un titre infectieux de  $5 \times 10^8$  u. f. p./ml ; il sert à la préparation soit des protéines totales synthétisées ( $^3\text{H}$ ), soit à la préparation des protéines de capsidie ( $^{14}\text{C}$ ).

#### *Protéines totales.*

$\text{S}_1$  est porté à 0,5 M urée et 1 p. 100 S. D. S. pendant 1 heure à  $37^{\circ}$  puis dialysé une nuit contre un tampon phosphate de sodium 0,01 M pH 7,1 contenant 0,1 p. 100 de S. D. S., 0,5 M urée et 0,1 p. 100 de 2-mercaptoéthanol. Les échantillons portés à une concentration finale de 10 p. 100 en saccharose sont ensuite déposés à la surface du gel ou bien conservés congelés.

#### *Protéines de capsides.*

$\text{S}_1$  est traité par le S. D. S. à 0,95 p. 100 puis centrifugé sur gradient constant de saccharose de 15 à 45 p. 100 à 24 000 tours/mn à  $+ 5^{\circ}\text{C}$  dans le rotor SW 25 de la centrifugeuse Beckman. Le pic viral obtenu est récolté puis dissocié (voir « Protéines totales »).

#### *Préparation des gels de polyacrylamide.*

Les gels utilisés sont des gels à 10 p. 100 d'acrylamide et à 0,27 p. 100 de diacrylate d'éthylène (*K & K Laboratories*). La polymérisation est catalysée par le persulfate d'ammonium (0,075 p. 100) et la N-N-N' tétraméthyl éthylène diamine. Le tampon utilisé est du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2 contenant 1 p. 100 de S. D. S.

Les gels ont 7 cm de long et 0,7 cm de diamètre. L'intensité du courant est de 8 mA/gel et la différence de potentiel de 4 volts/cm.

#### *Comptage de la radioactivité.*

Les gels sont congelés puis coupés à l'aide d'une lame de rasoir en rondelles de 1 mm. Chacune d'elles est recueillie dans le pot servant au comptage et dissoute dans 0,6 ml d'ammoniaque pure. On ajoute ensuite 10 ml de liquide de scintillation de BRAY (1960). Les comptages sont effectués dans un compteur à scintillation Packard Tri-Carb 3001.

## II. — RÉSULTATS

### A. — Dansylation

Lorsque l'on fait subir au virus, d'emblée, le traitement énergétique (Matériel et Méthodes) suivant : pH 10,5 en urée 8 M pendant 16 heures à  $40^{\circ}$  et qu'après dialyse on fait l'étude des groupes aminés N-terminaux, on obtient trois taches correspondant aux dérivés dansylés de la leucine, de la thréonine et de l'isoleucine. Ceci indique que la partie protéique du virus de la fièvre aphteuse est composée d'au moins trois peptides (fig. 1).

Le virus peut aussi être dégradé en deux étapes, toutes deux en urée 8 M mais tout d'abord à pH 8,6 puis à pH 10,5, à  $+ 40^{\circ}\text{C}$ .

Après traitement par l'urée 8 M, en tampon *Tris*-HCl 0,02 M, pH 8,6 pendant 1 heure, le virus dégradé est chromatographié sur DEAE-Sephadex A 25, équilibré avec le même tampon. Un premier pic sort de la colonne sans être absorbé ; il est de

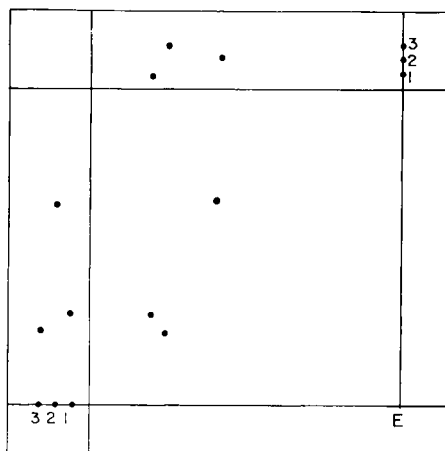


FIG. 1. — Chromatogramme bidimensionnel sur papier de polyamide des acides aminés N-terminaux dansylés, obtenus à partir de virus de la fièvre aphteuse traité à + 40°C par l'urée 8 M à pH 10,5.

Ils sont caractérisés par comparaison avec des acides aminés standards dansylés sur le même chromatogramme.

E, échantillon ; 1, isoleucine dansylée ; 2, thréonine dansylée ; 3, leucine dansylée.

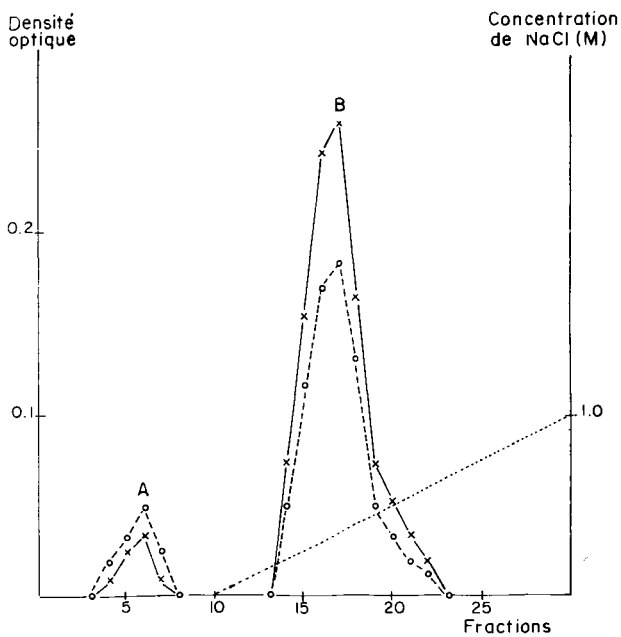


FIG. 2. — Chromatographie sur DEAE-Sephadex du virus de la fièvre aphteuse dégradé par l'urée 8 M à pH 8,6.

×—×—×, densité optique à 260 nm ; o—o—o, densité optique à 280 nm ; . . . . ., molarité du NaCl.

nature protéique (A). Ce qui reste du virus est élué à l'aide d'un gradient de chlorure de sodium (fig. 2). Le pic B est une nucléoprotéine si l'on considère le rapport des densités optiques à 260 et à 280 nm.

C'est pourquoi, après l'avoir dialysé contre le tampon 0,02 M, nous portons le pH de la solution à 10,5. Après 16 heures à + 40°C, nous la chromatographions comme précédemment. Nous obtenons alors (fig. 3) un pic protéique (C) non adsorbé et une

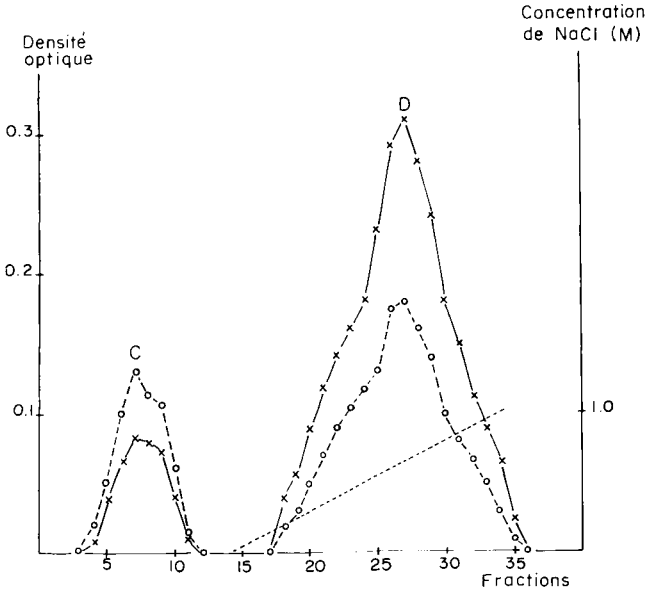


FIG. 3. — Chromatographie sur DEAE-Sephadex du résidu ribonucléoprotéique du virus de la fièvre aphteuse (pic B de la fig. 2), après dégradation par l'urée 8 M à pH 10,5.

× — — — —, densité optique à 260 nm ; o — — — — o, densité optique à 280 nm ; . . . . ., molarité du NaCl.

fraction (D) éluée par le gradient, hétérogène, mais dont le rapport des densités optiques à 260 et à 280 nm indique qu'il s'agit d'acide nucléique.

L'étude des acides aminés N-terminaux montre :

pour A : 1 seul N-terminal — la leucine.

pour C : 2 N-terminaux — l'isoleucine et la thréonine

pour D : 0 N-terminal, montrant ainsi la nature non protéique de ce pic.

### B. — Gels de polyacrylamide

Les courbes de la figure 4 montrent que la capsidite du virus de la fièvre aphteuse est composée de 5 peptides : P.C.<sub>1</sub> (protéine de capsidite n° 1), P.C.<sub>2</sub>, P.C.<sub>3</sub>, P.C.<sub>4</sub>, P.C.<sub>5</sub>.

On les retrouve au niveau des protéines synthétisées au cours du cycle viral avec en plus 8 polypeptides ne participant pas à la structure du virion : P.N.C.<sub>1</sub> (protéine non capsidale n° 1), P.N.C.<sub>2</sub>, P.N.C.<sub>3</sub>,..... P.N.C.<sub>8</sub>.

Remarquons déjà qu'il n'y a pas de pic radioactif dans la région proche de l'origine et correspondant à de grandes molécules protéiques.

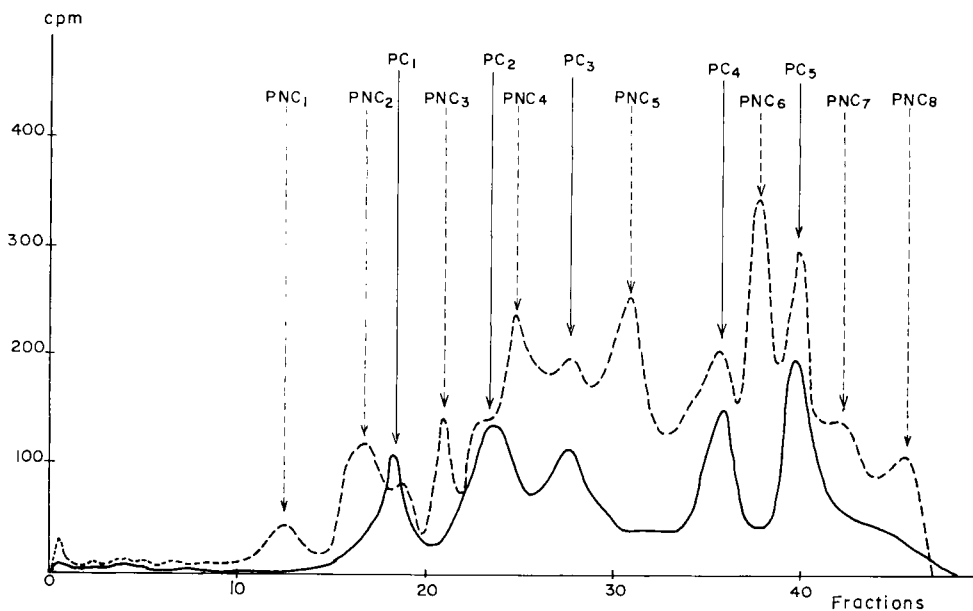


FIG. 4. — Électrophorégramme des protéines totales synthétisées lors du cycle viral (---<sup>3</sup>H) et des protéines isolées à partir du virus de la fièvre aphteuse purifié (—<sup>14</sup>C).

Gel à 10 p. 100 d'acrylamide ; 4 volt/cm ; 8 mA/gel ; durée de la migration : 5 heures.

## DISCUSSION

Les résultats que nous présentons ici, fondés sur deux types de techniques complètement différents, confirment notre hypothèse de la multiplicité des peptides dans la constitution de la capsidie du virus de la fièvre aphteuse (LAPORTE, 1968-1969).

Ceci est d'ailleurs une caractéristique des virus du groupe des Picorna, dont la partie protéique est également constituée de plusieurs chaînes polypeptidiques différentes. En effet, lorsqu'on examine en gels de polyacrylamide le virus de la poliomyélite (MAIZEL, 1963 ; SUMMERS et MAIZEL, 1968) et le virus de l'encéphalomyocardite (BURNESSE et WALTER, 1967), chacun montre quatre bandes alors que celui de l'encéphalite murine (RUECKERT et DUESBERG, 1966) en montre trois et les Cocksackies au moins deux (HOLLAND et KIEHN, 1968).

Tous ces travaux ont été effectués par électrophorèse. L'explication la plus logique est que ces virus contiennent plus d'une chaîne polypeptidique. Cependant il a été avancé que la multiplicité des bandes pourrait être due à des modifications chimiques, à des agrégations ou des coupures d'une protéine unique au cours de l'analyse (VAN DE WOUDE et BACHRACH, 1968).

En utilisant la dansylation nous avons démontré la validité de l'existence d'au moins trois peptides dans la capsidie du virus de la fièvre aphteuse. Par cette technique, nous ne pouvions pas mettre en évidence les groupes N-terminaux acylés ; d'autre part, il est possible que lorsque nous dialysons nos échantillons avant dansy-

lation, nous perdions un peptide de faible masse moléculaire (inférieure à 15 000) qui pourrait être analogue au V.P<sub>1</sub> du virus de la poliomyélite (MAIZEL, 1963).

Un autre fait original, établi au cours de cette étude, est la possibilité de dégrader le virus en deux étapes. Ce résultat semble confirmer que les protéines constituant la capsidie peuvent avoir des rôles différents en étant plus ou moins externes, ou plus ou moins liées à l'acide ribonucléique.

En accord avec les travaux de BROWN *et al.*, venant à la suite de nos résultats obtenus par dansylation, ceux de l'électrophorèse, que nous présentons ici, montrent que la capsidie protéique du virus de la fièvre aphteuse est constituée de cinq peptides différents. En outre, nous pouvons les identifier parmi les polypeptides synthétisés au cours du cycle viral.

Dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas pu mettre en évidence de protéine, unique précurseur des peptides viraux, que JACOBSON et BALTIMORE (1968) ont observée dans le cas du virus de la poliomyélite. La taille du génome du virus de la fièvre aphteuse est peu différente de celle du génome du virus de la poliomyélite ; le nombre des peptides qu'ils synthétisent est voisin. Le mécanisme de biosynthèse des protéines virales pourrait donc être le même, mais, dans notre système viral, ces précurseurs auraient une durée de vie très courte. L'utilisation d'analogues d'acides aminés permettant leur formation, mais non leur clivage, est en cours d'application au laboratoire de même qu'est en cours la détermination de la masse moléculaire des peptides produits.

#### *Rôle des différents peptides.*

La conjugaison des deux techniques que nous avons mises en œuvre devrait permettre de déterminer le rôle structural des différentes protéines du virion.

La comparaison des résultats obtenus avec différents mutants de stabilités variées, mais ayant conservé les caractères antigéniques du virus sauvage, montrera quel peptide ou quel groupe de peptides est responsable de la cohésion de la particule ou supporte les sites antigéniques. Les cartes peptidiques de ces protéines, après clivages enzymatiques et chimiques, mettront en évidence plus précisément, les régions ayant un rôle critique dans les propriétés de la capsidie du virus, et nous pourrons alors établir la séquence en acides aminés de ces fragments plus délimités. Il sera peut-être possible alors d'établir une relation entre la structure chimique au niveau des molécules et les propriétés de stabilité de ces virions.

*Reçu pour publication en février 1970.*

## SUMMARY

### THE SEPARATION AND ANALYSIS OF PROTEINS OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS

The protein structure of a fragile mutant of a type O Foot and Mouth Disease virus was studied by two approaches, one chemical and the other physical. The results are as follows :

1. Denaturation of purified virus by 8.0 M. urea at + 40°C and pH 10.2 made possible the demonstration of three different polypeptide components by dansylation of their NH<sub>2</sub> terminal

groups (fig. 1). Nevertheless, the virus could be degraded progressively. Treatment by 8.0 M urea at pH 8.6 led to the separation, after chromatography on DEAE-Sephadex, of a peptide with an  $\text{NH}_2$  terminal leucine (fig. 2) and a ribonucleoprotein residue. This ribonucleoprotein residue was itself dissociable under the conditions used for the intact virus and gave, after chromatography, ribonucleic acid and two peptides, one with an  $\text{NH}_2$  terminal isoleucine, the other with threonine (fig. 3). This suggested that these capsid peptides, which seem to be associated with the ribonucleic acid to differing degrees, might possess different functional roles.

2. Polyacrylamide gel electrophoresis of purified virus labelled with  $^{14}\text{C}$  amino acids and denatured by urea, sodium dodecyl sulphate, and  $\beta$ -mercaptoethanol, established that the actual number of capsid protein components in this strain of FMDV is five. Further, one could specifically identify in the gel the proteins synthesized during the viral growth cycle and relate them to their counterparts isolated from independently purified virus.

Our experimental conditions do not allow, at present, the conclusion that a large precursor protein is synthesized during the course of the growth of FMDV, as is the case for polio virus (JACOBSON and BALTIMORE, 1968) in spite of the close resemblance of these viruses in many other respects.

### RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASSO J., AYNAUD J.-M., PLART M.-F., 1966 a. Étude de mutants de virus aphteux obtenus par culture à basse température. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **110**, 233.
- ASSO J., AYNAUD, J.-M PORTALIER R., 1966 b. Sensibilité à l'acidité des souches de virus aphteux non pathogènes pour le porc. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **262**, 585.
- ASSO J., AYNAUD, J.-M., GOHRE 1966 c. Rapports entre la résistance à la chaleur et le pouvoir pathogène pour le porc de différents clones du virus aphteux. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **262**, 1604.
- ASSO J., 1967. Doctorat Thèse. *Fac. Sci.*, Paris, p. 72.
- BOEYE A., VAN ELSSEN, 1967. Alkaline disruption of Polio virus : Kinetics and Purification of R.N.A free particles. *Virology*, **33**, 335.
- BRAY G. A., 1960. *Analytical biochemistry*, **1**, (4-5), 279.
- BURNES A. T. H., WALTER D. S., 1967. Protein components of encephalomyocarditis virus. *Nature*, Lond, **125**, 1350.
- FRAENKEL-CONRAT H., SINGER, 1957. *Bioch. Biophys. Acta.*, **24**, 540.
- GRAY W. R., 1967. *Sequential Degradation plus Dansylation. In Methods in Enzymology*, Ed. by S. P. Colowick and N. O. Kaplan, New York : Academic Press, **11**, 469.
- HAAG J., SANTUCCI J., 1962. Établissement d'une souche cellulaire diploïde de rein de porc. *C. R. Acad. Sci.*, Paris, **255**, 1485.
- HOLLAND J. J., KIEHN E. D., 1968. Specific cleavage of viral proteins as steps in the synthesis and maturation of Enteroviruses. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **60**, 1015.
- JACOBSON M. F., BALTIMORE D., 1968. Polypeptide cleavages in the formation of Polio virus proteins. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **61**, 77.
- LAPORTE J., 1968. *Réunion de la société Française de Microbiologie, Section Virologie*. Strasbourg **11** mai 1968.
- LAPORTE J., 1969. The structure of Foot-and-Mouth Disease virus Protein. *J. Gen-Virology*, **4**, (4), 631.
- LWOFF A., LWOFF M., 1961. Remarques méthodologiques à propos de la thermosensibilité du développement viral. *Ann. Inst. Past.* Paris, **101**, 313.
- MAC PHERSON J. A., STOKER M. G. P., 1962. Polyoma Transformation of Hamster cells clones — an investigation for Genetic factors Affecting Cell Competence. *Virology*, **16**, 147.
- MAIZEL J., 1963. Evidence for multiple components in the structural protein of type I poliovirus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 483.
- PRUNET P., 1964. Modification du comportement des virus aphteux lors de passages successifs en culture de tissus à diverses températures. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **106**, 18.
- RUEKERT R., DUESBERG P. H., 1966. Non identical Peptide Chains in Mouse Encephalitis Virus. *Virology*, **17**, 490.
- SUMMERS D., MAIZEL J., 1968. Evidence for large Precursor Proteins in poliovirus synthesis. *Proc. Nat. Ac. Sci.*, **59**, 966.
- VAN DE WOUDE G. F., BACHRACH, 1968. Evidence for a single structural Polypeptide Foot and Mouth Disease virus. *Archiv. gesamte Virusforschung*, **23**, (4), 353.
- WILD T. F., BURKROUGHS J. N., BROWN F., 1969. Surface structure of Foot-and-Mouth Disease virus. *J. Gen. Virol.*, **4**, 313.