

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à la cartographie d'épitopes B sur la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV)

Maraschiello, Ciriaco

Award date:
1992

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Contribution à la cartographie d'épitopes B sur la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV).

MARASCHIELLO Ciriaco

Résumé

Le virus respiratoire syncytial bovin ou BRSV (famille paramyxoviridae, genre pneumovirus) est la principale cause des maladies respiratoires infectieuses chez les jeunes bovins.

Parmi les 8 protéines structurales du BRSV, la glycoprotéine de fusion (F) est la principale cible de la réponse immunitaire humorale. Celle-ci favorise la production d'anticorps neutralisants et non neutralisant. Ces anticorps neutralisants sont réputés protecteurs tandis que la réponse non-neutralisante est vraisemblablement impliquée dans les phénomènes immunopathologiques, associés à l'infection. L'étude de la cartographie des épitopes B de cette protéine est donc primordiale.

Dans ce but, l'expression de la protéine F en fusion d'une protéine de liaison au maltose (vecteur p-MAL-cR1) fut réalisée en vecteur procaryote E. coli. La mise au point de tests de reconnaissance de lysats bactériens à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-F fut entreprise. Des fragments de la protéine F ont été obtenus soit par digestion séquentielle soit par amplification PCR. Leur clonage en vecteur p-MAL-cR1 permettra leur expression. L'analyse de la réactivité des anticorps monoclonaux avec ces fragments protéiques constituera une première cartographie des épitopes B portés par la protéine F. Certains fragments pourront alors être utilisés dans le but d'induire une réponse hautement neutralisante.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1992

Promoteur : J.-J. Letesson

A l'issue de cette année, qu'il me soit permis de remercier le Professeur J.J. LETESSON pour tous les conseils prodigués au cours de ce travail.

Toute ma reconnaissance va à l'assistant K. WALRAVENS pour son aide précieuse, sa grande disponibilité et son extrême gentillesse.

Que Monsieur J.P. MATHEISE trouve ici tous mes remerciements pour son aide et ses conseils judicieux.

Je ne peux oublier les membres du laboratoire pour leur collaboration efficace et spontanée.

Que toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, soient assurées de mon entière gratitude.

Je voudrais également adresser un merci tout particulier à ma famille pour m'avoir permis d'entreprendre ces études.

TABLE DES MATIERES

1. Introduction	1
2. Matériel et méthodes	18
3. But du travail	59
4. Résultats	60
5. Discussions.....	84
6. Perspectives.....	87
7. Bibliographie.....	88

INTRODUCTION

1. Historique - Généralité
2. Description des virus humains et bovins
 - 2.1. Structure des virus
 - 2.2. Description des protéines
 - 2.3. Souches virales et humaines
3. La pathologie associée aux infections HURSV - BRSV
4. La réponse immunitaire contre le RSV
 - 4.1. Etat de la question
 - 4.2. Modèles
 - 4.3. Réponse immunitaire lors d'une infection
 - 4.3.a. Cinétique
 - 4.3.b. Réponse cellulaire
 - 4.3.c. Réponse humorale
 - A. Cible antigénique des anticorps
 - B. Anticorps neutralisants et protection
 - C. Mapping d'épitopes
 - D. Les anticorps maternels
 - D.1. Chez l'enfant
 - D.2. Chez le bovin
5. Les réinfections
6. Les mécanismes immunitaires responsables des lésions anatomo-pathologiques

Ordre de succession des gènes, 3'-5'	Taille des mRNAs, queue de mRNAs exclue ^a	Nombre d'acides aminés ^a	Poids moléculaire ^{a,b} kilodalton	Emplacement	Fonction	Propriétés additionnelles de la protéine
NS1	528	139	15.6	Pas dans virion	Inconnue	Légèrement acide
NS2	499	124	14.7	Pas dans virion	Inconnue	Basique
N	1197/1196	391/391	43.5/42.6	Nucléocapside	Protéine structurale de nucléocapside	Abondante et fortement complexée au RNA génomique
P	907	241	27.1	Nucléocapside	Composante de la polymérase?	Phosphorylée, relativement acide, pas de cystéine ni de tryptophane
M	952/938	256/256	28.7/28.7	Partie interne de l'enveloppe virale	Recouvrement intérieur de l'enveloppe virale	Relativement basique et hydrophobe. Le gène présente une deuxième ORF qui chevauche partiellement l'extrémité COOH terminale de la région codante du gène M, cette ORF code pour 75 acides aminés
SH	405/566	64/73	7.5/8.4	Surface des cellules infectées	Inconnue	Structure fortement hydrophobe de 28 acides aminés. Insertion dans les cellules infectées via l'extrémité C-terminale
G	918/838	298/257	32.6/28 84-90	Surface de l'enveloppe virale	Attachement au récepteur de la cellule-cible	Haute teneur en sucres, dont 90% sont liés à des résidus Sérine ou Thréonine. La protéine à un taux inhabituellement haut de ces deux acides aminés (31%) et ne comporte pas de séquence-signal NH ₂ terminale. Elle semble ancrée dans la membrane via une région hydrophobe.
F	1899/1892	574/572	63.5 68-70	Surface de l'enveloppe virale	Fusion de l'enveloppe virale avec la cellule-cible, formation de syncytia	Domaine d'ancrage COOH-terminal et peptide-signal du côté NH ₂ . Clivée en deux sous-unités F ₁ et F ₂ reliées par pont disulfure. F ₂ relativement hydrophile et contenant quatre à cinq sites pour l'addition de sucres N-liés. F ₁ présente un domaine de fusion hydrophobe NH ₂ -terminal.
M2 (22K)	957/958	194/186	22.2	Enveloppe virale	Inconnue	Hydrophile et très basique. Gène présentant une deuxième ORF capable de coder 90 acides aminés.
L	6578	2165	250	Nucléocapside	Polymérase?	Faible abondance dans les virions et les cellules infectées.

^a Chiffres concernant le HuRSV/BRSV,

^b Chiffres montrant le poids moléculaire avant (au-dessus) et après (en-dessous) glycosylation.

TABLEAU 1.1

Caractéristiques des gènes viraux du RSV (d'après Chanock & MacIntosh, 1990)

INTRODUCTION

1. HISTORIQUE - GENERALITE

Le HRSV (Human Respiratory Syncytial Virus) et le BRSV (Bovine Respiratory Syncytial Virus) appartiennent à la famille des paramyxoviridae et sont du genre pneumovirus.

PARAMYXOVIRIDAE : - PARAMYXOVIRUS (activité neuraminidasique et hémagglutinique)

- PNEUMOVIRUS :

 / sous-type A
HRSV \ sous-type B

BRSV - différents sous-
types

PMV : Pneumonic Murine Virus

TRT : Turkey Rhinotracheitis
Virus

- MORBILIVIRUS

Aucune activité neuraminidasique et hémagglutinique ne leur est associée.

Le HRSV est la cause principale de maladies respiratoires infectieuses chez les enfants de moins de quatre ans (R.M. CHANOCK AND MC INTOSH, 1990).

Le BRSV est, quant à lui, le facteur étiologique le plus important des maladies respiratoires chez les veaux de moins de neuf mois. Ce virus fut isolé pour la première fois par WELLEMANS, en Belgique, et par JACQUIER (MF. PACCAUD et C. JACQUIER, 1970) en Suisse.

Ce virus, de répartition mondiale, est responsable d'épidémies qui apparaissent principalement au début de l'hiver et occasionnent des pertes économiques importantes.

Le HRSV et le BRSV partagent des caractéristiques structurelles (KENNEDY et AL, 1989; LERCH et AL, 1989), antigéniques (TAYLOR et AL, 1989; LERCH et AL, 1989; OWELL et AL, 1987), épidémiologiques et pathologiques.

...

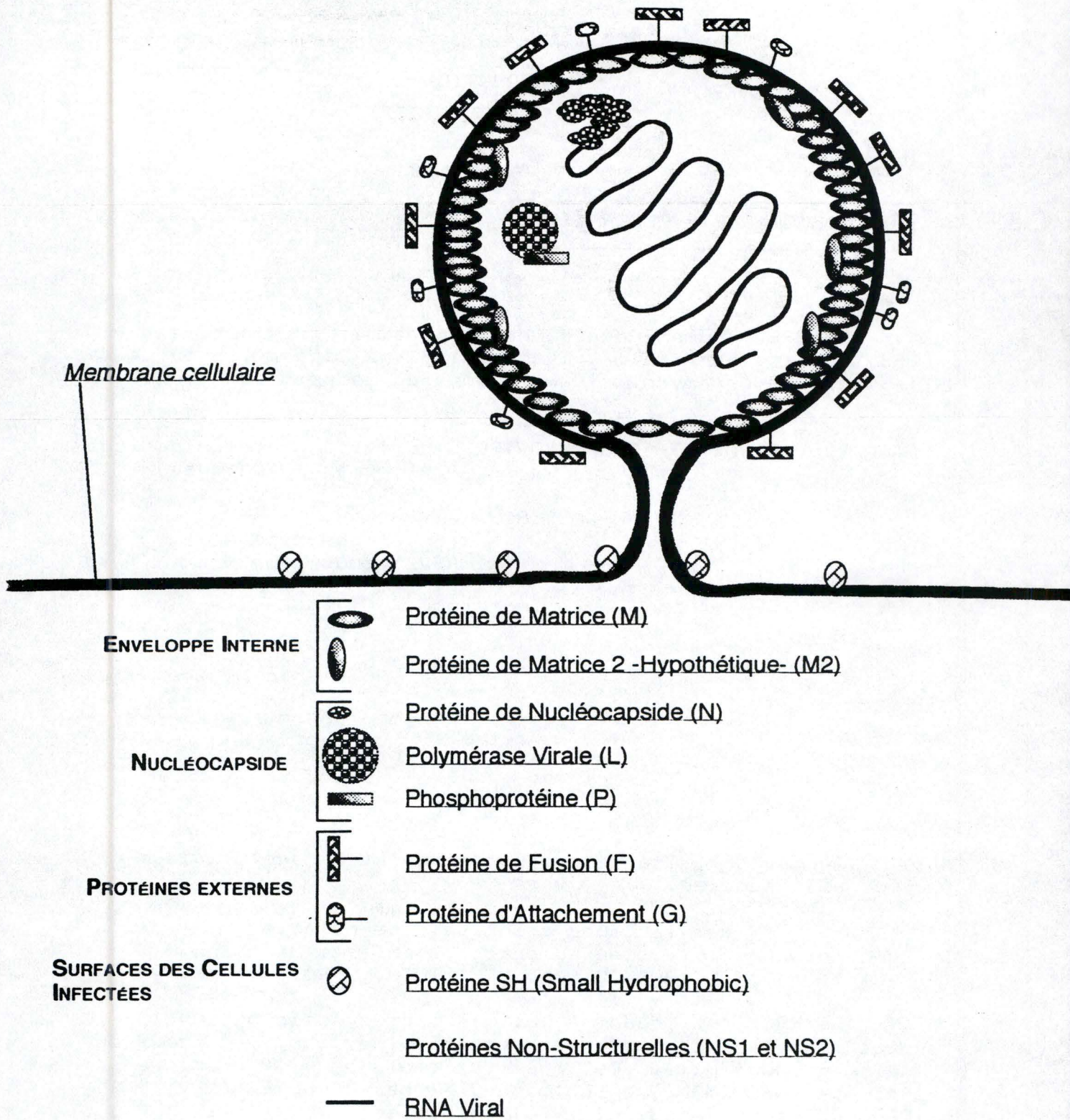


Figure I.1 : Représentation schématique d'un virion du RSV sortant d'une cellule infectée.

2. DESCRIPTION DES VIRUS HUMAINS ET BOVINS

2.1. Structures des virus (figure I.1)

Les RSV (humain et bovin) sont des virus enveloppés renfermant une nucléocapside hélicoïdale contenant un génome formé de simples brins d'ARN négatif d'une longueur de 15 Kb.

Grâce à différentes études, on a pu montrer que le génome du RSV code pour 10 mRNA monocistroniques traduits en protéines lors de l'infection

Sa carte génétique est la suivante :

3'-1C/NS1-1B/NS2-N-P-M-1A/SH-G-F-22 K/M2-L-5'

2.2. Description des protéines

Huit de ces dix protéines sont structurelles, seules les protéines 1B et 1C ne le sont pas. Les glycoprotéines majeures exprimées à la surface des cellules infectées et à la surface de l'enveloppe virale sont la protéine de fusion (F), la protéine d'attachement (G) (voir tableau I.1).

NS1/NS2/SH

NS1 (1C) - NS2 (1B)

Ces deux protéines ne sont pas structurelles, c'est-à-dire qu'elles sont détectées dans les cellules infectées et non dans les virions.

Leur poids moléculaire est de 15,6 kD pour la première et 14,7 kD pour la seconde. On ne connaît pas leur fonction.

SH (1A)

Cette protéine a un poids moléculaire de 7,5 kD et a un noyau hydrophobe de 28 AA ce qui lui permet de s'ancrer au niveau de la membrage cellulaire. Celle-ci ne se retrouve pas dans le virion et sa fonction est inconnue. Elle existe sous quatre formes glycosylées (15 kD - 30 kD) et non glycosylées (4,8 kD - 7,5 kD).

...

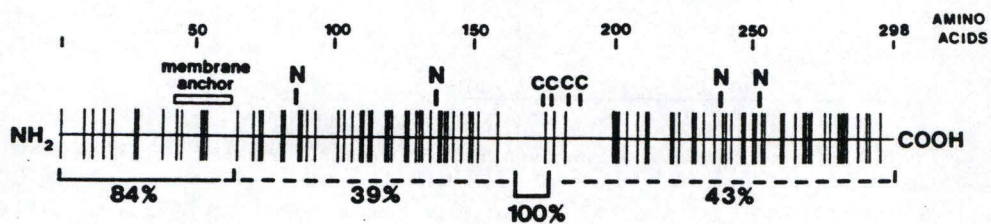


Figure 1.2 : Structure linéaire de la protéine G du sous groupe A (souche A2) et comparaison à la protéine correspondante d'une souche du sous groupe B (18537).

N = sites potentiels de N-glycosylation.

I = sites potentiels de O-glycosylation.

C = résidus cystéine extracellulaires.

Les chiffres indiqués sous la structure reorésente le pourcentage d'homologie entre les séquences des sous-groupes A et B.

N/P/L

Trois protéines sont présentes dans la nucléocapside

N : nucléoprotéine 43,5 kD
P : phosphoprotéine 27,1 kD
L : "large protein" 250 kD

N est une protéine abondante qui a une fonction structurale et est complexée avec le RNA génomique.

La protéine L contient 2165 Acides aminés (DAVID STEC AND PETER COLLINS, 1991) et serait la RNA polymérase virale dont la protéine P serait la sous-unité régulatrice (R.M. CHANOCK AND MC INTOSH, 1990). Il est à remarquer que la protéine P est fortement phosphorylée.

M/M2 (22K)

M est la protéine de matrice et a un poids moléculaire de 28,7 kD. On ne connaît pas sa localisation exacte dans l'enveloppe virale. On a aussi trouvé une seconde protéine de matrice : M2 (22 kD). M2 est hydrophobe et de fonction inconnue.

Protéine G

(figure 1.2)

C'est une glycoprotéine d'enveloppe.

La protéine G mature fait 84 - 90 kD : plus de 60 % de son poids moléculaire est attribué à des chaînes latérales d'hydrate de carbone dont 90 % sont de type O liés (fixées à un résidu sérine ou thréonine). Les 10 % restants sont de type N - liés, et seraient fixés aux résidus asparagine de la séquence acceptrice Asn - x - Ser/Thr (voir figure).

Toutes ces glycosylations (de type N et O) sont importantes pour l'expression de la protéine G à la surface cellulaire (G.W. WERTZ et AL, 1989).

La protéine G est ancrée dans la membrane par une région hydrophobe située du côté NH₂ - terminal (AA 41 --> 62). A remarquer que le côté carboxyterminal est orienté du côté extracellulaire (R.A. OLMSTED et AL 1988). ...

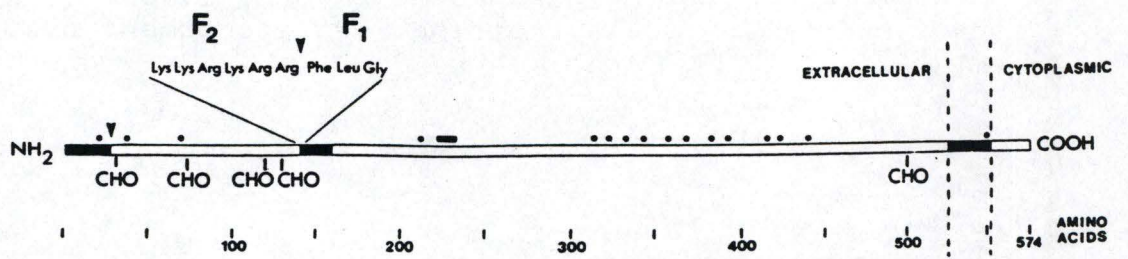


Figure I.3 : Structure linéaire de la protéine F du RSV

- région hydrophobe
- cystéine
- ▼ site de clivage

La glycoprotéine G a une fonction d'attachement (WALSH et AL, 1983), de fixation à sa cible cellulaire. Les comparaisons entre les séquences des protéines G des différentes souches virales ont révélé l'existence d'une région qui peut être impliquée dans l'attachement au récepteur de la cellule hôte. C'est une des rares régions conservées de treize acides aminés (164 --> 176) dans laquelle on retrouve deux résidus cystéines. Il y a aussi deux autres résidus cystéines aux positions 182 --> 186 qui sont conservés, eux aussi. Donc, quatre cystéines (AA hydrophobe) regroupées en cluster dans une région de 14 AA (173 --> 186) semblent très importantes pour la fonction d'attachement à la cible cellulaire (K. MC INTOSH AND R.M. CHANOCK, 1990) (voir figure I.2).

La protéine G du BRSV est différente tant au niveau antigénique qu'au niveau de sa séquence primaire de celle du HRSV. Il est à remarquer que les différences entre les deux protéines seraient responsables du fait que le HRSV et le BRSV infectent, in vitro, des types de cellules différents. Ces différences rendraient compte aussi de la spécificité d'espèces.

En effet, LERCH et AL (1990) ont montré que la région de 13 AA impliquée dans la fonction d'attachement chez les sous-groupes A et B du HRSV n'est que partiellement conservée au niveau de la protéine G du BRSV. Les quatre résidus cystéines sont, quant à eux, conservés au niveau de la protéine G des deux virus.

G pourrait se lier à la protéine F, probablement par ponts disulfures (P.L. COLLINS AND G. MOTTET, 1991). En effet, ARUMUGHAM et AL (1989 a) détectèrent de petites quantités d'hétérodimères F - G au niveau des cellules infectées.

Protéine F

(figure I.3)

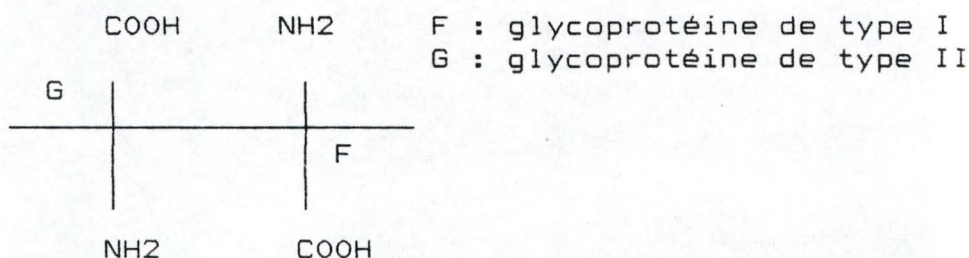
F est également une glycoprotéine d'enveloppe. Elle est responsable de la fusion des membranes virales et cellulaires. Elle rend donc possible la pénétration du virus dans la cellule hôte et la formation de syncytia (WALSH et AL, 1985).

En ce qui concerne l'organisation générale de la protéine F : son squelette protéique a un P_M de 63,5 kD. Elle a un peptide-signal à son extrémité NH₂ - terminale et un domaine d'ancrage à la membrane à son extrémité carboxyterminale (voir figure ci-dessous).

La protéine F est synthétisée en un précurseur Fo (69 kD) qui est N - glycosylé. Ce précurseur sera ensuite processé par endoprotéolyse en deux sous-unités F1 (49 kD) et F2 (20 kD) qui sont unies par ponts disulfures (FERNIE et AL, 1985; GRUBER AND LEVINE, 1985 b). Il semble que la formation du virus infectieux dépende d'un processus analogue décrit chez les paramyxovirus : clivage enzymatique post-translational de Fo (ANDERSON et AL, 1989).

F2 est du côté NH₂ et est relativement hydrophobe. Elle contient la plupart des sites d'attachement des chaînes latérales glycosylées de type N (K. MC INTOSH and R.M. CHANOCK, 1990).

Il est à noter que, au contraire de la protéine G, la protéine F a son extrémité NH₂ - terminale orientée de façon extracellulaire.



Lors de la biosynthèse, il y a oligomérisation de la protéine F au niveau du réticulum endoplasmique. En effet, les protéines F formeraient des tétramères. Les sous-unités F1 constitueraient le noyau du tétramère. Les sous-unités F2, elles, seraient orientées de façon externe.

Le clivage de ce précurseur Fo en F1 et F2 semblerait prendre place au niveau du trans-Golgi (P.L. COLLINS AND G. MOTTET, 1991).

Cette maturation de la protéine F semble être une condition nécessaire à son transport vers la surface cellulaire. La glycosylation faciliterait le clivage (P.L. COLLINS AND G. MOTTET, 1991).

Pourcentage d'homologie de séquence						
Nucléotides/Acides aminés						
	BRSV/HuRSV A ^a		BRSV/HuRSV B ^a		HuRSV A/HuRSV B ^a	
F	75	80	75	81	82	90
G	51.7	29	50.8	30	67.4	53
M	74	89				
M2	69	80		80		
N	81	93	81	93	86	96
SH	50	38	49	36	76	78

^a Les sous-groupes sont représentés par les souches "prototypes", à savoir A2 pour le sous-type A et 18357 pour le sous-type B.

TABLEAU 1.2
Homologie entre les diverses séquences déjà obtenues pour le RSV
(voir texte pour les références)

La séquence de six acides aminés basiques consécutifs (Lys (131) - Lys - Arg - Lys - Arg - Arg (136)) en amont du site de clivage (voir figure) sert de site d'action pour des protéases cellulaires. Cette digestion va libérer la partie NH₂ - terminale de F1 qui est hydrophobe et qui est responsable de l'activité fusogénique (Phe (137) - Leu - Gly - Phe - Leu - Leu - Gly - (143)) .

Comparaison séquence F HRSV - F BRSV

Par sonde cDNA, anticorps monoclonaux, antisérums bovins et humains et par séquençage, notre laboratoire a comparé la souche RB94 (WELLEMANS AND LEUNEN, 1985) du BRSV aux souches humaines (WALRAVENS et AL, 1990).

Il y a environ 75 % d'identité entre les séquences codantes de mRNA de la protéine F du HRSV (sous-types A et B) et celle de la souche bovine RB 94.

La sous-unité F1 de RB94 a, respectivement, 88 % et 89 % d'homologie avec les sous-types A et B du HRSV. L'homologie concernant la sous-unité F2 est quelque peu inférieure (67 % et 68 % ,voir tableau 1.2).

Il semblerait qu'une plus grande pression sélective ait été appliquée au niveau de la région F1 (conservation de l'activité fusogénique) (WALSH et AL, 1986).

Il y a quatre sites accepteurs potentiels de glycosylation de type N au niveau de la protéine F de la souche RB94.

Trois d'entre eux sont bien conservés chez les souches humaines (figure : position 27, 70 et 500). Deux autres sites de N - glycosylation sont présents chez les souches humaines et absents de la souche bovine (K. WALRAVENS et AL, 1990).

2.2. Souches virales humaines et bovines (tableau I.2)

- Souches humaines -----

Sur base de la réactivité avec des anticorps monoclonaux (MoABS), de l'antigénicité et de la masse moléculaire (surtout au niveau de la protéine P), deux sous-groupes A et B ont été identifiés (MUFSON, D.A., 1985).

Ces deux sous-groupes présentent des différences antigéniques au niveau de la protéine G mais aussi et dans une moindre mesure au niveau de la protéine F et des protéines N et P (GIMENEZ, N.B., 1986).

Il a été démontré que les souches des deux sous-types co-circulent dans le temps et dans l'espace. Enfin, il n'a pas encore été démontré clairement que les souches de chaque sous-type présentaient des degrés de pathogénicité différente (HENDRY, R.M., 1986).

- Souches bovines

Les anticorps monoclonaux dirigés contre la glycoprotéine G (protéine d'attachement) des sous-groupes A et B du HRSV ne réagissent pas avec le virus bovin (BAKER et AL, 1992). Les sérums polyclonaux humains et bovins ne sont pas "cross-réactifs" en ce qui concerne la glycoprotéine G. Etant donné que les différences antigéniques majeures se situent au niveau de la protéine G pour les sous-groupes A et B, ces résultats suggèrent que le BRSV appartient à un groupe antigénique différent de celui du HRSV.

De plus, le séquençage du gène de la glycoprotéine G du BRSV révèle une homologie de séquence de 29 à 30 % seulement, avec les souches humaines (LERCH, R.A., 1990).

En ce qui concerne la protéine de fusion (F), celle du HRSV et celle du BRSV présentent des caractéristiques comparables.

Certaines différences ont tout de même été mises en évidence au niveau de masse moléculaire de certaines protéines du BRSV (BAKER et AL, 1992).

Certaines analyses d'antigénicité ont montré que le BRSV serait, lui aussi, divisé en deux sous-groupes (WALRAVENS et AL, manuscrit en préparation). On a aussi relevé des différences de poids moléculaire au niveau des protéines P et F du BRSV, ceci étant dû à des modifications post-translationnelles différentes de celles du HRSV (JOHNSON, P.R. and P.L. COLLINS, 1988 et 1990).

3. LA PATHOLOGIE ASSOCIEE AUX INFECTIONS HRSV - BRSV

La pathologie associée aux infections par ces deux virus est similaire à celle provoquée par d'autres virus : bronchiolyse accompagnée ou non de pneumonie. Durant la bronchiolyse, il y a nécrose cellulaire.

Occasionnellement, on observe aussi une prolifération de l'épithélium bronchique et destruction des cellules épithéliales ciliées (AHERNE W. et AL, 1970).

Les lésions histologiques sont caractérisées par des infiltrations de lymphocytes, de cellules plasmiques et de macrophages au niveau des bronches et des parois alvéolaires. Les tissus sous-muqueux et adventiciels deviennent oedémateux et la sécrétion du mucus est excessive.

Tout ceci conduit à l'obstruction des bronchioles avec collapsus ou emphysèmes. L'état peut s'aggraver et donner une pneumonie : épaissement des parois accompagné d'une infiltration de cellules mononucléaires et les espaces alvéolaires sont remplis de liquide (K. MC INTOSH AND R.M. CHANOCK, 1970).

Chez certains jeunes veaux, des syncytia avec des inclusions éosinophiles sont observées dans les alvéoles (WELLEMANS et AL, 1970).

4. LA REPONSE IMMUNITAIRE CONTRE LE RSV

4.1. Etat de la question

- En ce qui concerne les moyens de défense mis en place par l'organisme pour se protéger de l'infection par le virus, plusieurs faits sont difficilement explicable: des enfants ou des veaux souffrent dans leurs premiers mois de vie de pneumonies à RSV alors qu'ils devraient être protégés par leurs anticorps maternels.
- On ne comprend pas aussi le fait qu'il puisse y avoir tant chez l'enfant que chez le veau, réinfection même en présence d'anticorps circulants à un taux assez élevé.
- Quels sont les mécanismes immunologiques impliqués dans la pathogénie de l'affection qui seraient en tout ou en partie responsables des lésions tissulaires observées?
- A quoi est dû le fait qu'aucun vaccin ne soit disponible pour le HRSV et pourquoi ceux réalisés pour le BRSV soient peu efficaces?

4.2. Modèles

De nombreux travaux ont été réalisés sur le HRSV mais la plupart d'entre eux découlent d'essais effectués sur des animaux de laboratoire (souris Balb/c et rat Cotton) chez qui on ne sait qu'imparfaitement reproduire la maladie, ce qui limite certaines interprétations.

Quant aux travaux sur le BRSV, ils sont encore très fragmentaires et ne permettent pas d'avoir une vue d'ensemble sur l'origine des problèmes immunologiques associés à une infection par le BRSV.

4.3. Réponse immunitaire lors d'une infection

4.3.a. Cinétique

On observe dans les poumons de souris Balb/c infectées par le RSV une réponse T cytotoxique (CTL) spécifique qui atteint un niveau optimal du septième au neuvième jour.

Cette réponse CTL locale est précédée d'une réponse lymphoproliférative rapide spécifique du virus. Après infection, on observe aussi une production d'interféron accompagnée d'une activité cytotoxique de type NATURAL KILLER (NK).

Cette réponse cellulaire cytotoxique CTL et NK, qui est la première à apparaître après infection, est très importante pour l'élimination du virus des poumons.

Lorsque la réponse humorale est déclenchée, le virus est pratiquement absent de tous les tissus (ANDERSON et AL, 1990).

Il apparaît que cette réponse humorale ne jouerait un rôle que lors de réinfections et n'interviendrait pas dans l'élimination du virus lors d'une première infection.

4.3.b. Réponse cellulaire

Le principal antigène reconnu par les CTL est 22K puis en ordre décroissant : N, F, M, S~~H~~ (1A), 1B (CHERRIE et AL, 1992).

On a montré que le transfert passif de cellules CTL spécifiques du RSV à des souris immunodéficientes permet à ces souris d'éliminer le virus (CANNON et AL, 1987).

De plus, si on neutralise le système lymphoïde B (traitement par anticorps anti-u), les souris ainsi traitées se débarrasseront aussi bien du virus que celles dont le système lymphoïde B est intact.

Une autre preuve de l'importance de la réponse CTL est la suivante : des souris traitées à l'aide d'anticorps anti-CD4 et anti-CD8 éliminent plus difficilement le virus que des souris non traitées .

Cependant, si il est acquis que le système im-

...

munitaire cellulaire est important pour l'élimination de l'antigène viral dans les poumons infectés, il est également admis que celui-ci joue un rôle important dans les problèmes immunopathologiques associés à cette infection. Ce point sera développé par ailleurs.

4.3.c. La réponse humorale

A. Cible antigénique des anticorps

Chez les enfants atteints par le H' RSV, les deux glycoprotéines externes (G et F) sont les principales cibles d'une réponse immunitaire :

- Des séra polyclonaux dirigés contre les protéines G et F purifiées ou contre des sérums provenant d'animaux inoculés avec de la vaccine recombinante exprimant les protéines F neutralisent le virus en culture tissulaire (OLMSTED et AL, 1986; PORTELA A. et AL, 1989; STOTT, E.J. et AL, 1987).
- Les réponses neutralisantes et protectrices contre la protéine G sont spécifiques des sous-groupes tandis que les réponses anti-F sont "cross-réactives" avec les souches des deux sous-groupes viraux du HRSV (A et B) (OLMSTED et AL, 1986; STOTT, E.J., 1987).
- La majorité des anticorps monoclonaux ont de faibles indices de neutralisation. Cependant, des mélanges de quelques anticorps anti-G montrent un effet additif dans le test de neutralisation (ANDERSON, L.J et AL, 1988; GARCIA-BARRENO, B., 1989), expliquant la capacité de séra polyclonaux anti-G dans la neutralisation du virus.

On peut aussi trouver des anticorps dirigés contre les protéines P, M, N, 22K, 1A. L'antigénicité des protéines 1B et 1C est mal connue.

Les anticorps spécifiques de la protéine N n'ont pas d'activité protectrice (TAYLOR et Al, 1984).

Chez les veaux infectés au BRSV, F et N sont les protéines les plus immunogènes.

...

B. Anticorps neutralisants et protection

Plusieurs travaux ont montrés que le transfert passif d'anticorps sériques ou monoclonaux permettait de limiter la réplication virale dans les poumons infectés. Cependant, il n'a pas été possible de montrer une corrélation entre le titre neutralisant d'anticorps sériques passivement acquis et la limitation de la réplication virale ce qui implique un rôle de l'immunité cellulaire.

Cette capacité de limiter la réplication du virus par des anticorps monoclonaux ne semble pas être liée à l'isotypie de ces anticorps monoclonaux (TAYLOR et AL, 1984). Plus récemment, PRINCE et AL ont suggéré que l'activité protectrice des anticorps, chez le rat Cotton, ne dépendait ni de leur action activatrice du complément, ni de la cytotoxicité cellulaire dépendant de ces anticorps (PRINCE et AL, 1990).

Seuls les anticorps inhibiteurs de fusion en transfert passif sont capables de neutraliser activement le virus, ceci étant le résultat de travaux sur la souris et le bovin (TAYLOR et AL, communication personnelle).

C. Mapping d'épitopes

Les épitopes reconnus par les anticorps les plus neutralisants sont conservés au niveau des souches humaines (sous-types A et B) et bovines (GARCIA - BARRENO et AL, 1989; TRUDEL et AL, 1987; ANDERSON et AL, 1988).

Grâce à des tests de compétition entre différents anticorps monoclonaux, on a pu identifier différents sites antigéniques au niveau de la protéine F.

En règle générale, ces zones sont également reconnues par les systèmes immunitaires humains et murins (TAYLOR et AL, 1992).

La localisation de ces sites au niveau de la séquence protéique utilise deux approches :

- a. Utilisation des peptides synthétiques par la technique du PEPSCAN afin d'examiner la réactivité d'anticorps monoclonaux et de séra polyclonaux vis-à-vis de ceux-ci (TRUDEL et AL, 1987; BOURGEOIS et AL, 1991; MARTIN-GALLARDO et AL,

...

1991).

- b. Isolement de virus qui échappent à la neutralisation (Escape Mutants) par les monoclonaux anti-F afin d'identifier les acides aminés nécessaires à la constitution de l'épitope (LOPEZ et AL, 1990).

Récemment, on a cartographié sur F deux domaines antigéniques. Le premier site contient plusieurs "overlapping" épitopes localisés dans un site résistant à l'action de la trypsine de la sous-unité F1 (ARBIZA et AL, 1992).

En ce qui concerne les épitopes de neutralisation de la protéine G reconnus par des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines, ceux-ci sont très variables, même parmi les souches du même sous-groupe antigénique (GARCIA-BARRENO, B. et AL, 1989).

D. Les anticorps maternels

D.1. Chez l'enfant :

Rappelons que les anticorps maternels sont transférés via le placenta (BRAMBELL, 1970) au niveau du fœtus et sont d'isotypes IgG1 car seules celles-ci sont capables de passer la barrière placentaire (BIRELLA, NUNES AND TAMAGNINI, 1972).

Chez les enfants âgés de 4 à 8 mois, la présence d'anticorps maternels dirigés contre les glycoprotéines du RSV auraient un effet dépressif sur la réponse immunitaire (PARROTT et AL., 1973). Ces enfants répondent aux glycoprotéines F et G mais ne présentent qu'un faible titre en anticorps après infection, ceci facilitant les réinfections (MURPHY et AL, 1986).

Des travaux effectués sur la souris Balb/c ont montré qu'une IgG 1 anti-G maternelle avait un effet inhibiteur sur la réponse cytotoxique (BANGHAM et AL, 1986) chez le nouveau-né.

...

Il est concevable qu'un titre élevé en anticorps anti-G réduirait le priming de la réponse cellulaire T (RAMMOHAN et AL, 1981). Cette inhibition du priming de la réponse T peut prédisposer à une infection persistante ou à l'exacerbation de l'infection (RAMMOHAN et AL, 1981).

Puisque ce sont les enfants âgés de mois de 6 mois qui présentent les symptômes les plus graves de la maladie et qui ont le taux le plus important d'anticorps maternels, on a suggéré que ceux-ci aggraveraient la maladie (CHANOCK et AL, 1970).

Malgré cet effet inhibiteur sur la réponse immunitaire des anticorps maternels, le transfert passif d'immunoglobulines à haut titre en anticorps neutralisants chez des enfants à risques, s'est révélé tout à fait efficace en terme de protection (GROOTHUIS et AL, 1991).

D.2. Chez le bovin :

Chez le bovin, les anticorps maternels sont essentiellement d'isotype IgG 1 et sont dirigés contre les protéines virales F et N (WESTENBRINK et AL, 1989).

Certains travaux ont démontré que chez le bovin, la prise de colostrum contribue à l'élimination du virus inoculé expérimentalement et à diminuer les signes cliniques de la maladie (BALKNAP et AL, 1991). On a également pu démontrer que les anticorps maternels, chez le bovin, sont capables de limiter aussi bien au niveau sérique qu'au niveau des muqueuses la production d'anticorps spécifiques et cela quelque soit l'isotype (KIMMAN et AL, 1987).

5. LES REINFECTIONS

Les réinfections sont courantes chez les humains et les bovins. La résistance à la réinfection est en corrélation avec le taux d'anticorps neutralisants anti-F et anti-G. Néanmoins, cette protection est de courte durée (HALL et AL, 1991).

Les différences antigéniques entre les souches sauvages facilitent les réinfections au RSV (ex.: HRSV : sous-groupes A et B). D'autres facteurs sont responsables de la facilité de réinfection :

-Lors d'infections de leucocytes mononucléaires humaines, à l'aide du RSV, on a remarqué une activité inhibitrice qui affecte l'action de l'IL-1 (SALKIND et AL, 1991).

De plus, il y a aussi une nette diminution de l'expression de molécules d'adhésion intercellulaire ICAM1 et LFA-1. On remarque aussi une réduction de la production d'IFN.

Ces différents phénomènes pourraient être responsables d'une suppression très précoce de l'expansion clonale des lymphocytes spécifiques du virus et contribuer ainsi au phénomène de réinfection (SALKIND et AL, 91 b).

Dans le cas du BRSV : on a constaté, chez des moutons infectés expérimentalement, une réduction du rapport des lymphocytes T CD4/CD8. Ceci conduisant à une dépression de la réponse proliférative (WOLDIHIWET et AL, 1991).

...

6. LES MECANISMES IMMUNITAIRES - RESPONSABLES DES LESIONS ANATOMOPATHOLOGIQUES

Dans les années 60, une expérience de vaccination de jeunes enfants à l'aide de virus RSV inactivé à la formaline a douloureusement révélé l'existence d'une composante immunitaire dans la pathogenèse de l'infection au RSV. Cette expérience malheureuse a beaucoup freiné les travaux sur la vaccination contre le RSV tout au moins dans l'espèce humaine. En effet, on a constaté à cette époque que non seulement les enfants vaccinés n'étaient nullement protégés par rapport au groupe témoin mais qu'en plus ils présentaient des symptômes beaucoup plus intenses en cas d'infection. Cette expérience a été répétée sur le rat cotton et il semblerait que les problèmes liés à cette vaccination soient plus à rapprocher de la préparation du virus à la formaline que de son inactivation à la chaleur (PRINCE et AL, 1986). Vaux-Peretz et Al (VAUX-PERETZ et AL, 1990) prétendent que ces problèmes d'aggravation de la pathologie ne doivent pas être associés à une seule protéine puisque des expériences d'immunisation de souris à l'aide de protéines F, G et N montrent que ces trois protéines augmentent les lésions induites par une infection d'épreuves.

Les travaux de Routlege (ROUTLEGE et AL, 1988, JONHSON et AL, 1987) impliqueraient plus spécialement la protéine F dans ces phénomènes immunopathologiques. Selon ces auteurs, le traitement du virus à la formaline détruirait les épitopes inducteurs d'une réponse protectrice et provoquerait ainsi l'émergence d'une réponse favorisant les problèmes immunopathologiques. Une réduction du rapport entre le titre en anticorps neutralisants et le titre en anticorps ~~totaux~~ vis-à-vis des protéines F et G a été observée (PRINCE et AL, 1986). Ces anticorps non neutralisants présents lors de l'infection ou produits en quantité importante lors de l'infection pourraient augmenter les lésions hitosphatologiques en provoquant une réaction d'Arthus (type III). Le rôle de ces anticorps n'a cependant pas été examiné ni en activation de complément, ni en cytotoxicité médiée par le complément.

Welliver et Al. ont postulé qu'une même réaction d'hypersensibilité de type I peut se développer chez des enfants infectés par le HRSV. Ainsi, différents groupes ont trouvé une association entre une sécrétion rapide et importante d'IgE anti-HRSV et la sévérité de l'affection pulmonaire (WELLIVER et AL, 1984; WELLIVER 1988).

Cependant, tous les enfants hospitalisés pour des problèmes de pathologie associés au RSV n'ont pas d'anticorps IgE détectables dans leurs sérums (WELLIVER et AL, 1984; WELLIVER, 1988). De plus, il est improbable que le taux d'IgE atteigne rapidement un niveau important lors d'une primo-infection.

Pour leur part, GERSHWIN et AL (GERSHWIN et AL, 1990) n'ont pu trouver une corrélation stricte entre le taux d'IgE et les signes cliniques de la maladie lors d'une infection expérimentale réalisée sur le bovin.

On pense également que les anticorps peuvent aggraver le cours de la maladie en facilitant l'infection des monocytes et des macrophages. Cette infection des macrophages aurait pour effet d'accroître la libération de LTC₄ qui induirait une activation de la cascade des mécanismes de l'inflammation (ANANABA et AL, 1991). En pratique hospitalière, du LTC₄ a pu être dosé dans des échantillons nasopharyngés d'enfants infectés par le HRSV. CHONMAITREE et AL (CHONMAITREE et AL, 1991) démontrent que des leucocytes mononucléaires bovins infectés in vitro par le BRSV libèrent un facteur stimulant la sécrétion d'histamine. De faibles quantités d'histamine ont d'ailleurs pu être détectées dans des poumons de bovins infectés naturellement par le BRSV. Des coupes colorées de ces poumons ont montré qu'une dégranulation mastocytaire s'était produite.

L'élément C du complément a également pu être détecté dans ces poumons sans qu'on puisse pourtant mettre en évidence de complexes immuns (KIMMAN et AL, 1986). Qui plus est, on a également pu montrer que des cellules infectées par le RSV activent le complément en l'absence d'anticorps (KIMMAN et AL, 88c). L'activation des mastocytes et de la cascade du complément est sans doute liée puisque les éléments C3a et C5a provoquent la libération d'histamine et d'autres médiateurs mastocytaires. De plus, tous les bovins souffrant d'une dyspnée aiguë lors d'une infection naturelle au RSV, présentent des anticorps anti-RSV d'isotypie G1 et/ou M connus pour leur capacité à activer le complément (KIMMAN et AL, 89a). Une réaction d'Arthus peut donc jouer un rôle important dans la pathogénie du RSV. En accord avec cette hypothèse, on a pu observer chez des rats infectés expérimentalement par le RSV un afflux de neutrophiles 24 heures après l'infection. Cependant, une deuxième vague d'infiltration de neutrophiles accompagnés par des lymphocytes a pu être mise en évidence chez ces animaux 4 jours après l'infection (ANDERSON et AL, 1990). Cette observation est plutôt caractéristique d'un phénomène d'hypersensibilité de type IV. Des expériences d'infection au RSV de souris BALBc déplétées en cellules B ou celles T CD4+ ou CD8+ et d'expériences de transfert passif de lymphocytes T cytotoxiques à des souris BALBc ont permis de constater que les lymphocytes T cytotoxiques, s'ils contribuent à l'élimination de l'antigène viral du poumon infecté, augmentent de façon notable les lésions pulmonaires (CANNON et AL, 1987; GRAHAM et AL, 1991a et b). ...

MATERIEL ET METHODES

1. Souches et plasmides utilisés

1.1. Souches bactériennes

- 1.1.1. XL1-Blue
- 1.1.2. HB101

1.2. Plasmides

- 1.2.1. pMAL - cRi
- 1.2.2. pBluescript

1.3. Milieux de culture pour bactéries

- 1.3.1. NZYM liquide
- 1.3.2. NZYM solide
- 1.3.3. Milieu SOC

2. Extraction d'ADN plasmidique d'E. Coli

2.1. Extraction rapide d'ADN (Miniprep de plasmide)

- 2.1.1. Solutions et tampons utilisés
- 2.1.2. Repiquage des cellules
- 2.1.3. Miniprep proprement dite

2.2. Extraction d'ADN plasmidique d'E. Coli en grandes quantités (Midiprep QIAGEN)

- 2.2.1. Solutions et tampons utilisés
- 2.2.2. Protocole

3. La restriction d'ADN plasmidique

- 3.1. Principe
- 3.2. Les tampons de restriction
- 3.3. Réaction de restriction

4. Electrophorèse d'ADN dans un gel d'agarose

- 4.1. Principe
- 4.2. Tampons et solutions utilisés
- 4.3. Electrophorèse
- 4.4. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose

- 4.4.1. Principe
- 4.4.2. Tampons et solutions utilisés
- 4.4.3. Protocole

5. Purification et précipitation de l'ADN

6. Ligation de molécules d'ADN linéaires ayant des bouts droits ou des bouts protrudants

- 6.1. Principe
- 6.2. Protocole
- 6.3. Remarque

7. Transformation bactérienne

7.1. Transformation bactérienne classique

- 7.1.1. Principe
- 7.1.2. Protocole de préparation d'E. Coli XL1-Blue compétentes
- 7.1.3. Protocole de transformation proprement dite
- 7.1.4. Remarque

7.2. Transformation bactérienne par électroporation

- 7.2.1. Principe
- 7.2.2. Protocole de préparation de bactéries compétentes (XL1-Blue, Hb 101)
- 7.2.3. Protocole d'électroporation proprement dite

8. Screening des transformants par sonde marquée à la digoxigénine

- 8.1. Principe du marquage
- 8.2. Tampons et solutions utilisées
- 8.3. Protocole de marquage
- 8.4. Protocole d'hybridation sur boîte de pétri
- 8.5. Protocole de lavage et de révélation
 - 8.5.1. Tampons et solutions utilisées
 - 8.5.2. Technique

9. Expression des protéines de fusion par les transformants positifs
 - 9.1. Expression au niveau du vecteur pMAL - cRI et lyse des bactéries
 - 9.1.1. Tampons utilisés
 - 9.1.2. Protocole

10. Electrophorèse unidirectionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de sodium dodecylsulfate (SDS)
 - 10.1. Principe
 - 10.1.1. Gel de polyacrylamide
 - 10.1.2. SDS-PAGE
 - 10.2. Solutions utilisées
 - 10.3. Mode opératoire
 - 10.3.1. Préparation des gels
 - 10.3.2. Migration
 - 10.4. Révélation
 - 10.4.1. Coloration au bleu de Coomassie
 - 10.4.2. Décoloration
 - 10.4.3. Séchage du gel

11. Western Blotting (transfert électrophorétique sur nitrocellulose)

12. Protocole de révélation immunoenzymatique des antigènes fixés sur nitrocellulose
 - 12.1. Solutions utilisées
 - 12.2. Protocole

13. Polymérase Chain Reaction (PCR)
 - 13.1. Principe
 - 13.2. Les primers
 - 13.3. Conditions de clonage des séquences obtenues par PCR
 - 13.4. Conditions de réaction et nombre de cycles
 - 13.5. Purification des séquences amplifiées
 - 13.5.1. Solutions utilisées
 - 13.5.2. Protocole de purification

MATERIEL ET METHODES

1. SOUCHES ET PLASMIDES UTILISES

1.1. Souches bactériennes

Les souches utilisées sont :

E. Coli XLI-Blue (BULLOCK, 1987)

E. Coli HB 101 (BOYER AND ROULLAND - DUSSOIX,
1969; BOLIVAR AND BACKMAN, 1979).

1.1.1. XLI - Blue

Les principales caractéristiques de son génotype sont :

end A1 : améliore le rendement et qualité des minipreps d'ADN plasmidique en diminuant la concentration d'endonucléases.

rec A1 : réduit la recombinaison au millième de son taux normal, la recombinaison entre ADN endogène et, exogène est ainsi minimisée.

(lac-) : délétion au niveau de l'opéron lactose; la souche ne peut pas métaboliser le lactose.

Cette souche possède l'épisome F' permettant la formation de pili sexuels; il porte les caractères suivants :

pro AB, lac **I**_q ZDM15, TN10 (T et R)

Les principales caractéristiques phénotypiques qui en découlent sont :

Tn10 (T et R) : confère à la souche la résistance à la tétracycline. La protéine codée par ce gène modifie la membrane de la bactérie et empêche ainsi le transport de l'antibiotique dans la cellule.

Lac **I**_q ZDM15 : permet la sélection des plasmides recombinants par un test de couleur (qui sera détaillé dans la présentation du plasmide pBluescript SK+ et pMAL-cRI).

...

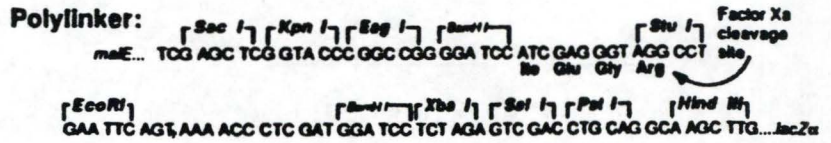
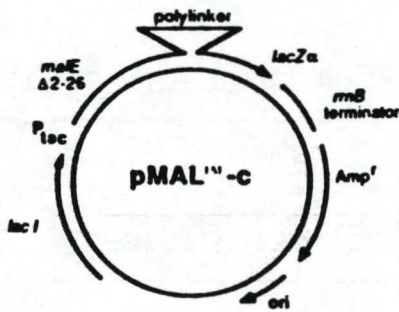


Figure II.1 : Représentation du vecteur pMAL-cRI et de son site mutple de clonage(MCS).

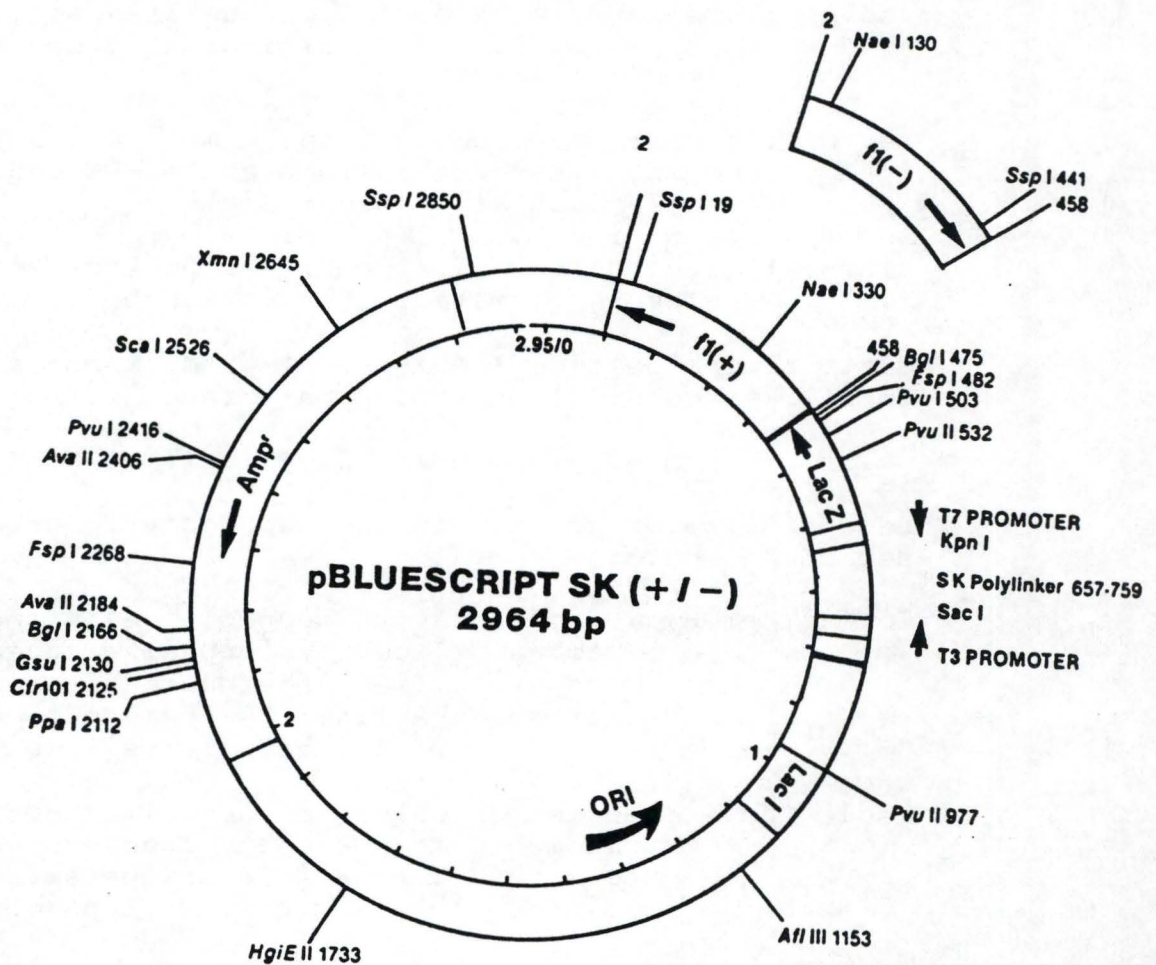


Figure II.2 : Représentation du vecteur pBluescript SK .

* Lac Iq : mutation qui augmente la force de promoteur du gène codant pour le répresseur de l'opéron lactose.

* Lac Z Δ M15 : gène de la B-galactosidase (un des gènes de l'opéron lactose) délété dans la partie codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine; il y a production d'une protéine inactive pouvant être complémentée intragéniquement.

1.1.2. HB101

Son génotype est :

sup E44 hsd 520 (2B mB) rec A13 ara-14 pro A2 lac Y1 gal K2
rpsL20 xyl-5 mtl-1

Cette souche n'est pas résistante à l'ampicilline et en présence de cet antibiotique, sa croissance est inhibée. Seule la souche transformée avec un plasmide comportant un gène de résistance à l'ampicilline pourra croître de façon normale sur un milieu sélectif. Cette souche est hautement transformable.

1.2. Plasmides

Les plasmides utilisés sont :

pMAL - cRI (BIOLABS)
pBluescript (STRATAGENE)

Ces plasmides ont été choisis dans le but de produire la protéine cible sous forme de protéine de fusion et permettre ainsi sa purification.

1.2.1. pMAL - cRI (BIOLABS)

Le vecteur PMAL - cRI d'une longueur de 6100 pb a été conçu pour produire des protéines fusionnées à la maltose binding protein (MBP).

Un gène peut être inséré dans le site EcoRI du MCS (Site Multiple de Clonage) plasmidique et ceci en phase avec le cadre de lecture du gène mal E (codant pour la MBP). L'insertion de ce fragment d'ADN disruptera la séquence de fusion malE-Lac Z préexistante sur le vecteur. Ceci pourra permettre un test de sélection de plasmides recombinants par un test de couleur (Transformation effectuée avec la souche XLI Blue).

...

pBluescript SK Polylinker and Sequence Primer

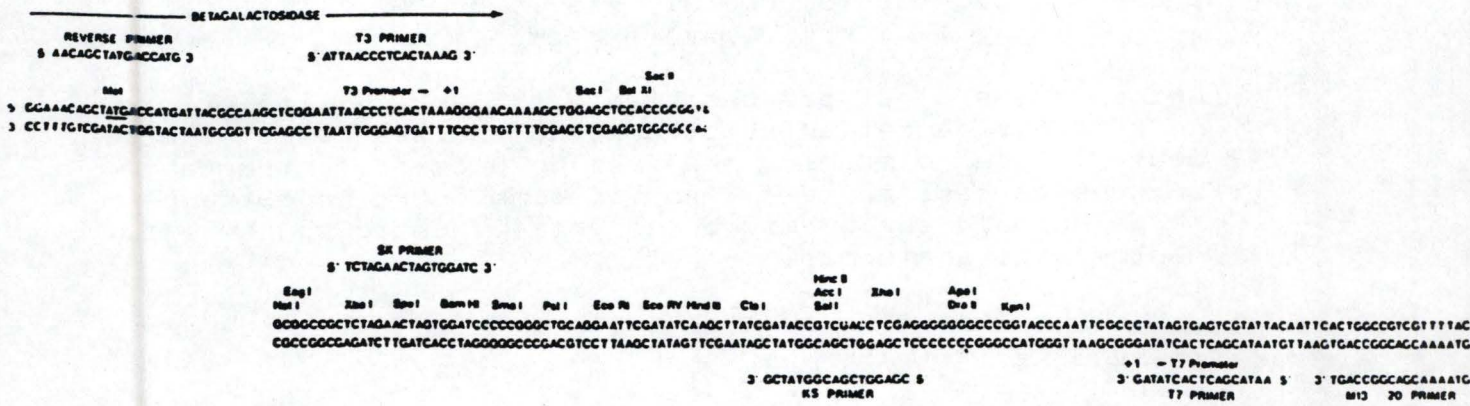


Figure II.3 : Description du site multiple de clonage (MCS) du vecteur pBluescript SK

Le gène Mal E au niveau du vecteur ne possède plus la séquence signal, permettant à la protéine de fusion de rester dans le cytoplasme.

La protéine de fusion ainsi produite peut être purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne amylose.

La séquence codant pour les quatre acides aminés Ile - Glu - Gly - Arg est présente en amont du site EcoRI. Ceci permettra le clivage de la protéine d'intérêt de la MBP avec la protéase spécifique qu'est le facteur Xa reconnaissant la séquence ile - glu - gly - arg (voir figure II.1).

1.2.2. pBluescript SK+ (STRATAGENE) (figure II.2)

Ce vecteur d'une longueur de 2964 pb, est un phagemide, c'est-à-dire un hybride entre un plamide et un phage.

Il possède une origine de répllication dans E. Coli (ORI colE1) qui lui permet de se trouver en un grand nombre dans la cellule (vecteur "multicopy"); il possède également une origine de répllication phagienne.

Son gène AmpR de résistance à l'ampicilline est responsable de la production d'une b-lactamase qui clive la boucle β -lactame de l'ampicilline et permet ainsi aux clones possédant ce vecteur de pousser sur un milieu contenant cet antibiotique; le gène AmpR est donc un marqueur de choix pour sélectionner ces colonies.

Le gène LacZ précédemment évoqué fait partie de l'opéron lactose; il code pour la β -galactosidase, une enzyme métabolisant le lactose. Le pBluescript possède le promoteur lac, l'opérateur et la partie du gène codant pour l'extrémité N-terminale de la protéine (appelée peptide α , inactive sans la partie C-terminale). Lorsqu'une souche E. Coli XL1-Blue a été transformée par pBluescript, il y a complémentation intragénique, les parties N-terminale (codée par le plasmide) et C-terminale (codée par l'épisome F') de la protéine permettant d'obtenir une enzyme fonctionnelle.

Dans la partie N-terminale du gène lacZ porté par pBluescript se trouve une série de 21 sites de restriction, introduits via un oligonucléotide de synthèse; cette insertion permet encore au peptide α de complé-
menter la souche XL1-blue pour l'activité β -galactosidase. Cet ensemble de sites de restriction est appelé Site Multiple de Clonage (MCS; Figure 3). L'introduction d'un fragment d'ADN dans un des sites de restriction du MCS entraîne la disruption du gène lacZ de pBluescript et la disparition de la production de peptide α .

...

Lors de la transformation de E. Coli XL1-Blue, il n'y aura plus de β -galactosidase fonctionnelle, ce qui est facilement repérable par un test coloré des colonies bactériennes.

Les deux sites extrêmes du MCS sont Kpn I et Sac I; suivant l'orientation du MCS dans le vecteur, celui-ci sera appelé pBluescript SK ou KS. Dans le pBluescript SK, la transcription de lacZ se fait du site Sac I vers le site Kpn I. Le plasmide utilisé dans ce travail est dérivé de pBluescript SK : le site Kpn I a été remplacé par un site BgI II.

De part et d'autre du MCS se trouvent les promoteurs T3 et T7. Ces promoteurs phagiens permettent la transcription des deux brins de l'ADN inséré dans le MCS en ARN grâce aux polymérases T3 et T7. Donc quel que soit le sens d'insertion de l'ADN cloné, il est possible de transcrire le brin d'ADN ayant la séquence codante.

L'origine de répllication f1 du phage filamenteux F permet d'obtenir un brin monocaténaire du vecteur avec l'aide d'un phage helper; celui-ci rend possible la répllication et l'empaquetage de ce simple brin en virion qui peut ainsi être exporté comme une particule de phage. Il existe deux variantes du vecteur pBluescript : + et -, suivant l'orientation de l'origine f1. Le vecteur utilisé est pBluescript SK+, la forme monocaténaire obtenue lors de la répllication phagienne contenant les brins codants des gènes lacZ et AmpR.

1.3. Milieux de culture pour bactéries

Dans ce travail, le milieu utilisé est toujours un milieu riche contenant de l'ampicilline et de la tétracycline. Il existe sous deux formes : liquide et solide.

1.3.1. NZYM liquide

Composition :

NZ amine	10 g / 1 l	d'eau distillée (DiFco)
NaCL	5 g / 1	(Fluka)
Yeast-Extract	5 g / 1	(Gibco BRL)
MgSo4 - 7H2O	2 g / 1	(UCB)

...

Autoclaver.

Lorsque le milieu est refroidi (environ 55°C), on ajoute les antibiotiques, soit l'ampicilline (BOEHRINGER) à une concentration finale de 100 mg / ml (stock : 100 mg / ml d'eau stérile; conserver à - 20°C) ou la tétracycline (Sigma) à une concentration finale de 12,5 mg / ml (stock de la tétracycline : 12,5 mg / ml d'eau stérile; conserver à - 20°C).

1.3.2. NZYM solide

Il est de même composition que le NZYM liquide, auquel on ajoute 1,5 % d'agar.

1.3.3. Milieu SOC

2 % bactotryptone	(DIFCO)
0,5 % Yeast-Extract	(GIBCO BRL)
10 mM NaCl	(FLUKA)
2,5 KCl	(UCB)
10 mM MgCL2 . 6H2O	(MERCK)
10 mM MgSO4 . 7H2O	(UCB)
20 mM Glucose	(MERCK)

2. EXTRACTION D'ADN PLASMIDIQUE D'E. COLI

2.1. Extraction rapide d'ADN (Miniprep de plasmide)

2.1.1. Solutions et tampons utilisés

- P1

50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA ajuster à PH8

- Tampon de lyse

60 ml KOAC 5M ou NaOAc 5M
11,5 ml HAc glacial
28,5 ml H₂O

- Solution RNAase

980 ul d'eau distillée.
20 ul de RNAase (provenant d'une solution à
50 mg/ml).

- Solution de phénol - chloroforme :

- . Solution de phénol : phénol auquel on ajoute de la 8-hydroxyquinoline à une concentration finale de 0,1 % et équilibrée contre le tampon adéquat (TE dans ce cas-ci).

L'hydroxyquinoline est un anti-oxydant, un inhibiteur de RNAase et donne à la solution une teinte jaune qui permet d'identifier les deux phases.

- . Solution de chloroforme : chloroforme auquel on ajoute de l'alcool isoamylique (24:1).
- . Solution de phénol - chloroforme : les deux solutions décrites ci-dessus sont équilibrées contre le même tampon (TE).

Cette solution permet d'extraire et d'inactiver toutes les protéines d'une solution d'ADN.

phénol 50 ml
chloroforme 50 ml
alcool isoamylique 2ml
hydroxyquinoline 0,05 g

Saturer avec 100 ml de TE, centrifuger cinq minutes à 5000 rpm (rotor GSA Sorval), éliminer le TE et recommencer deux fois (ne pas éliminer le dernier volume de TE).

...

2.1.2 Répiquage des cellules

- Préparer différents tubes avec 3 ml de milieu NZYM contenant de l'ampicilline.
- Avec une anse de platine, chauffée entre chaque prélèvement, prendre différentes colonies sur boîte de pétri et resuspendre dans différents tubes numérotés.
- Mettre à - 37°C la nuit sous agitation.

2.1.3. Miniprep proprement dite

- Récupérer stérilement dans différents eppendorfs 1 ml de cellules en culture (le reste au frigo).
- Centrifuger les eppendorfs 5 minutes 13000 rppm.
- Enlever le surnageant et resuspendre le culot dans 200 µl de P1.
- Ajouter ensuite à chaque eppendorf 400 µl de NaOH 0,2 M - SDS 1 % préparer extemporanément.
Mélanger.
- Laisser 10 minutes sur glace.
- Ajouter 300 µl de Tampon de lyse.
- Centrifuger 10 minutes 12000 rpm à 4°C.
- Verser le surnageant dans un eppendorf contenant 500 µl de Phénol-Chloroforme.
Vortexer 30 secondes.
- Centrifuger 5 minutes 13000 RPM.
- Ajouter au surnageant (phase aqueuse + DNA) 500 µl d'isopropanol pour précipiter le DNA.
Mettre 45 minutes à - 70°C.
- Centrifuger dix minutes 13000 RPM à 4°C, puis aspirer l'isopropanol.
Ajouter 1 ml d'éthanol 70 % pour laver les sels et vortexer.
- Centrifuger 10 minutes 13000 RPM à 4°C.

...

- Sécher le culot.
- Resuspendre dans 20 µl d'une solution contenant de la RNAase.
- Mettre 10 minutes à 37°C.
- Conserver à - 20°C.

2.2. Extraction d'ADN plasmidique d'E. Coli en grandes quantités : Midiprep (QIAGEN)

2.2.1. Solutions et tampons utilisés

P1 : 100 mg / ml RNAaseA, 50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA, pH 8,0
(à conserver à 4°C)

P2 : 200 mM NaOH, 1 % SDS

P3 : Idem que KOAc de miniprep

QBT : 750 mM NaCl
50 mM MOPS (FLUKA) (ajuster à pH7)
15 % éthanol
0,15 % Triton X-100

QC : 1,0 M NaCl
50 mM MOPS (FLUKA) (ajuster à pH7)
15 % éthanol

QF : 1.25 M NaCl
50 mM MOPS (ajuster à pH7)
15 % éthanol

2.2.2. Protocole

- Préculture : inoculer 5 ml de NZYM + Amp par une colonie de bactéries transformées et faire pousser une nuit à 37°C sur un agitateur.
- Culture : inoculer 50 - 100 ml de NZYM + Amp dans un Incuber une nuit à 37°C sur un agitateur.
- Transférer les 50 - 100 ml de culture dans un tube COREX pour rotor GSA SORVALL et centrifuger à 5000 rpm pendant 15 minutes.
- Resuspendre le culot bactérien dans 4 ml de tampon P1.
- Ajouter 4 ml de solution P2, homogénéiser doucement et incuber 5 minutes à température ambiante.

...

- Ajouter ensuite 4 ml de la solution P3, mixer délicatement et laisser sur glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger à 4°C pendant 15 minutes à 12000 RPM. Retirer le surnageant.
- Centrifuger le surnageant à 4°C pendant 15 minutes à 12000 rpm pour obtenir un lysat "particle free"
- Equilibrer une colonne QIAGEN-Tip 100 avec 3 ml de tampon QBT et la laisser se vider.
- Mettre le surnageant obtenu lors de la dernière centrifugation dans la colonne et le laisser entrer par gravité.
- Laver la colonne avec 10 ml de buffer QC.
- Eluer le DNA avec 5 ml de buffer QF.
- Précipiter le DNA avec 7/10 de volume d'isopropanol et centrifuger à 4°C pendant 30 minutes (12000 rpm).
- Retirer l'isopropanol et ajouter de l'éthanol 70 %. Centrifuger 5 - 10 minutes.
- Enlever l'éthanol 70 % et sécher 30 minutes à 37°C.
- Resuspendre le DNA dans 200 - 300 μ l d'eau distillée.
- Conserver à - 20°C.

5'...GGGCCC...3'
3'...CCCGGG...5'

Figure II.4 : Représentation de la séquence de reconnaissance pour l'enzyme *Apa* I qui génère des extrémités 3' protrudantes.

5'...GATATC...3'
3'...CTATAG...5'

Figure II.5 : Représentation de la séquence de reconnaissance pour l'enzyme *Eco* RV qui génère des extrémités aveugles.

5'...GAATTC...3'
3'...CTTAAG...5'

Figure II.6 : Représentation de la séquence de reconnaissance pour l'enzyme *Eco* RI qui génère des extrémités 5' protrudantes.

3. LA RESTRICTION D'ADN PLASMIDIQUE

3.1. Principe

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent une séquence précise dans l'ADN double-brin et qui coupent à un endroit déterminé dans cette séquence de reconnaissance ou, pour certains enzymes, à proximité. La plupart des enzymes de restriction ont une séquence de reconnaissance de 4 ou 6 pb qui est un palindrome (c'est-à-dire que la séquence est identique sur les deux brins d'ADN).

Deux exemples sont les enzymes EcoRI et EcoRV dont les sites de reconnaissance sont des hexanucléotides palindromiques (figure II.4 et II.5). Il existe deux types d'enzymes : les premières coupent au milieu du site de reconnaissance, faisant ainsi apparaître une coupure à bouts droits (francs, aveugles) comme dans le cas de l'enzyme EcoRV (figure II.5); les secondes coupent à quelques nucléotides de distance sur chacun des deux brins d'ADN générant des bouts collants (protrudants). Dans ce second cas, les extrémités libres peuvent être 3' OH comme l'enzyme Apa I (figure II.6) ou 5' P comme l'enzyme EcoRI (figure II.4).

Les enzymes utilisées sont commercialisées par BRL et BOEHRINGER. Elles sont conservées à - 20°C.

3.2. Les tampons de restriction

Ces tampons sont 10 x concentrés par rapport à la concentration d'utilisation dans la réaction de restriction. Ils sont le plus souvent livrés avec l'enzyme.

3.3. Réaction de restriction

La réaction de restriction fait intervenir l'ADN (de miniprep : 20 ul ou de midiprep : 250 ou 500 ng d'ADN), un dixième du volume final de tampon adéquat concentré 10 x, l'enzyme de restriction et de l'eau stérile jusqu'au volume final (10 U/ μ l). Incuber 2 heures à la température conseillées (le plus souvent 37°C). La réaction est arrêtée par une dénaturation à 75°C ou par l'EDTA amené à une concentration finale de 10mM pH 7,5.

...

Le nombre d'unités d'enzyme à ajouter est calculé comme suit : par définition, une unité d'enzyme coupe 1 μg d'ADN de phage λ . Connaissant d'une part la taille de ce phage (50 kb) et le nombre de sites de restriction de l'enzyme utilisée dans le phage et d'autre part la taille du plasmide à restreindre et le nombre de sites de clivage pour l'enzyme dans ce même plasmide, il est aisé de calculer la quantité d'enzyme à utiliser.

Exemple

Restriction de 500 μg de PMAL-cRI par l'enzyme PstI.

- Le plasmide PMAL-cRI contient un site de restriction pour Pst I et a une taille de 6100 pb, soit 6,1 Kb.
- Le phage λ contient 7 sites de restriction pour Pst I et a une taille d'environ 50 Kb.
- Sachant qu'une unité d'enzyme coupe 1 μg d'ADN de phage λ , il nous faudra utiliser 1 U d'enzyme
 - . divisée par deux car on n'utilise que 500 ng de plasmide.
 - . divisée par sept car il y a sept fois moins de coupures à réaliser par molécule.
 - . multipliée par 50/6,1 car la taille du plasmide étant inférieure à celle du phage, le nombre de molécules pour une même quantité d'ADN sera supérieure.

La formule à appliquer sera :

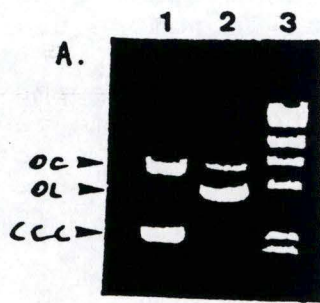
$$1U \times \text{quantité d'ADN } (\mu\text{gr}) \times 50 \text{ kb} \times \text{nombre de sites du plasmide}$$

$$1 \mu\text{gr} \times \text{taille du plasmide} \times \text{sites du phage } \lambda$$

$$\text{Il faudra utiliser } 1 U \times (1/2) \times (1/7) \times (50/6,1) \\ = 0,59 U$$

Le volume d'enzyme à ajouter ne peut pas dépasser 10 % du volume total de réaction sinon l'enzyme est inhibée par le glycérol de son tampon de stockage.

...



Piste: 1: plasmide non-restreint.
 2: plasmide partiellement restreint.
 3: marqueur de taille λ / *Hind*III.

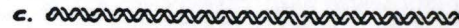
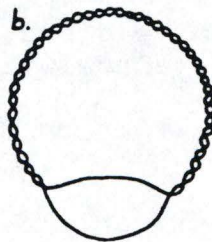


Figure II.7 : A. Ordre de migration des formes OC, OL et CCC sur un gel d'agarose.
 B. Représentation schématique des formes CCC (a), OC (b) et OL (c).

4. ELECTROPHORESE D'ADN DANS UN GEL D'AGAROSE

4.1. Principe

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la quantité de ces fragments. Elle est basée sur le fait que l'ADN est chargé négativement (groupes phosphates) et donc migre vers l'électrode positive dans un champ électrique. Le rapport entre la charge et la masse des molécules d'ADN étant constant, il est nécessaire de réaliser cette électrophorèse dans un gel d'agarose pour séparer les molécules suivant leur taille, les pores du gel limitant la migration.

Dans ces conditions, la vitesse de migration dans le gel dépend essentiellement de 4 facteurs :

- La masse moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double-brin linéaire migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur masse moléculaire.
- La concentration en agarose. Les gels à forte concentration (1,5 ou 2 %) servent à séparer des molécules d'ADN de petite taille (100 pb à 1500 pb) tandis qu'à faible concentration (0,8 %) les gels servent à séparer des molécules de taille supérieure (500 pb à plus de 10 kb).
- La conformation de l'ADN. Les formes plasmidiques CCC (Completely Closed Circular) ou superenroulée, OC (Open Circular) ou circulaire cassée sur un seul brin (nick) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC > OL > OC (figure II.7).
- Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. Si ce voltage est trop important, la résolution diminue.

4.2. Tampon et solution utilisés

Composition des solutions et tampons utilisés :

Le TAE dans lequel est réalisé et est plongé le gel :

...

λ *Hind* III Tailles (pb): 23130
9416
6657
4361
2322
2027
(564)



Figure II.8 : Représentation sur gel d'agarose 0,8% du profil de migration du marqueur de taille λ restreint par *Hind* III

TAE 50x

242 gr	TRIS
57,1 ml	Acide acétique glacial
100 ml	0,5 M EDTA (pH8)

pour 1 litre d'eau distillée.

La solution d'alourdisseur 10 x :

50 %	glycérol
100 mM	Na ₂ EDTA pH 8,0
1 %	SDS
0,1 %	Bleu Bromophénol

4.3. Electrophorèse

L'agarose est ajouté à du TAE (solution à 0,8 %) et le tout est porté à ébullition puis refroidi à 50°C. Le bromure d'éthidium est ajouté à une concentration finale de 0,5 mg/ml (solution stock à 10 mg/ml conservée à l'abri de la lumière). Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN (par là même hautement mutagène et donc dangereux) et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

Lorsque tous les échantillons sont introduits dans les puits, placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TAE. Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 V aux extrémités de la cuve pendant environ deux à quatre heures. Enfin, placer le gel sur un transilluminateur UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$) pour visualiser les bandes d'ADN et photographier. Deux évaluations peuvent être réalisées :

- . La taille des fragments. Dans un puits adjacent à celui des échantillons, placer un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par une enzyme de restriction générant des fragments de taille connue. Le marqueur utilisé dans ce travail est λ /Hind III pour évaluer des bandes de 0,5 kb à 10 kb (voir figure II.8).
- . La quantité d'ADN dans une bande. La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium intercalée dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité d'ADN du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par comparaison la quantité d'ADN de l'échantillon étudié.

...

4.4. Extraction d'une bande d'ADN d'un gel d'agarose (KIT GENE CLEAN, Bio 101)

4.4.1. Principe

Cette méthode permet d'isoler d'un mélange de restriction le fragment d'ADN qui nous intéresse. L'électrophorèse ayant séparé les fragments d'ADN, le gel est incisé devant la bande à récupérer (côté électrode +) et si nécessaire également derrière pour ne pas contaminer la bande choisie par un fragment un peu plus grand. Mettre le(s) fragment(s) d'agarose dans un eppendorf.

4.4.2. Solution utilisée

- Solution NEW : 7 ml de solution du kit
+140 ml H₂O
+165 ml éthanol absolu

4.4.3 Protocole.

- Ajouter au fragment d'agarose contenant la bande voulue, 1 ml de NaI (dissoudre 100 gr de NaI dans 50 ml d'eau et conserver au frigo).
- Incuber à 45 - 55°C pendant 5 - 10 minutes et vérifier que tout l'agarose soit fondu.
- Ajouter la solution GLASS MILK (Résine)
 - 10 µl si on a une quantité d'ADN inférieure ou égale à 5 µg.
 - 20 µl si quantité d'ADN supérieure à 5 µg + 1 µl par 0,5 µg de DNA supplémentaire.
- Incuber 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 secondes et éliminer le surnageant.
- Laver dans une solution de NEW trois fois de suite :
 - Resuspendre le culot dans 200 à 700 µl de solution NEW.
 - Centrifuger 15 secondes et éliminer le surnageant.

- Eluer le DNA du GLASS MILK.

- a - Resuspendre dans 5 à 20 μ l d'eau stérile.
- b - Incuber 2 - 3 minutes à 45 - 55°C.
- c - Centrifuger 30 secondes. Récupérer le surnageant.
- d - Répéter a, b, c avec 5 à 10 μ l d'eau stérile.

5. PURIFICATION ET PRECIPITATION D'ADN

Il est parfois nécessaire d'inactiver l'enzyme de restriction que l'on a fait réagir avec la solution d'ADN.

On peut le faire de deux manières :

- Dénaturer à la chaleur, mais certaines enzymes n'y sont pas sensibles.
- Inactiver par l'EDTA : amener à une concentration finale de 10mM pH 7,5.
- On peut aussi extraire les protéines d'une solution aqueuse d'ADN au phénol-chloroforme (voir protocole de miniprep).

Ajouter à un volume d'ADN (si le volume est trop petit, l'amener à 100 ou 200 μ l avec du TE ou H₂O stérile) un volume égal de phénol-chloroforme. Vortexer 20 secondes et centrifuger à 12000 rpm 31 minutes. Récupérer la phase aqueuse supérieure dans un second eppendorf.

Ensuite, on précipite cette solution aqueuse d'ADN :

- Ajouter 1/10 du volume de la solution de NaCl 5M et 2,5 volumes d'éthanol 100 % froid (- 20°C). Vortexer.
- Incuber 45 minutes à - 80°C.
- Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à 4°C.
- Eliminer le surnageant et ajouter 500 μ l - 1 ml d'éthanol 70 % froid (- 20°C) pour éliminer les solutés piégés dans le culot.
- Centrifuger 5 minutes 12000 rpm 4°C.
- Eliminer le surnageant et sécher sous vide.
- Resuspendre dans la quantité désirée d'eau distillée stérile.

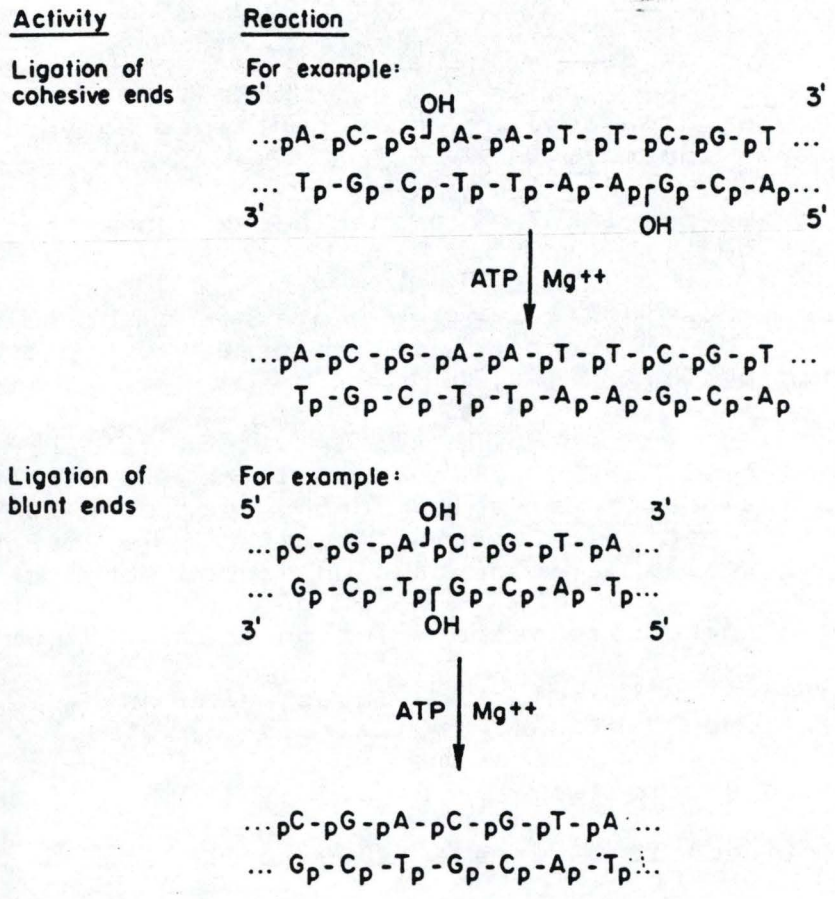


Figure II.9 : Réaction de ligation cartalisée par la T4 DNA ligase.

6. LIGATION DE MOLECULES D'ADN LINEAIRES AYANT DES BOUTS DROITS OU DES BOUTS PROTRUDANTS COLLANTS

6.1. Principe

La ligation de molécules d'ADN clivées à bouts droits, même par des enzymes différentes, est toujours possible, tandis que des molécules d'ADN clivées à bouts collants ne peuvent être assemblées entre elles que si les nucléotides protrudants sont dits compatibles.

La ligation est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4. Cette enzyme catalyse la formation de liens phosphodiesters entre le phosphate 5' d'une extrémité d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyle 3'. L'enzyme requiert de l'ATP et des cations Mg²⁺ pour être active (figure II. 9) (PHEIFFER, 1983).

6.2. Protocole

-
- 1 µl = 1 unité de T4 DNA Ligase (suffisant pour liguer 5 µg d'ADN à bouts collants)
 - 1,5 µl de tampon Ligase 10 x (BOEHRINGER)
 - 12,5 µl d'ADN en solution.
 - Incuber une nuit à 16°C et deux heures sur table.

6.3. Remarques

-
- La ligation à bouts francs étant moins efficace, il est souvent nécessaire d'augmenter la quantité d'enzyme.
 - Lors d'une réaction de ligation, il est nécessaire d'effectuer un contrôle positif pour vérifier l'activité de la ligase dans les conditions qui lui ont été imposées. Pour ce faire on réalise la réaction sur un vecteur linéarisé par la même enzyme que celle utilisée dans l'expérience et on vérifiera sa relinéarisation.

...

7. TRANSFORMATION BACTERIENNE

7.1. Transformation bactérienne classique

7.1.1. Principe

Cette réaction consiste à faire pénétrer un plasmide dans une bactérie. Les conditions expérimentales sont telles qu'une seule molécule d'ADN pénètre par bactérie. Cette bactérie, pour laisser entrer la molécule d'ADN, doit avoir une paroi et une membrane perméables à cet ADN. La bactérie est dite compétente. La bactérie E. Coli, Gram-négative doit être rendue artificiellement compétente en étant plongée dans une solution hypotonique de sel (notamment CaCl_2). On pense que la membrane et la paroi se déstabilisent, la bactérie se gonfle, prenant l'aspect d'un sphéroplaste. L'ADN formerait avec le calcium un complexe résistant aux désoxyribonucléases qui peut pénétrer dans la cellule lors du choc thermique à 42°C . Les cellules transformées sont ensuite placées dans du milieu riche (NZYM liquide) qui permet aux cellules de régénérer une paroi normale et au(x) gène(s) de résistance introduit(s) de commencer à s'exprimer.

L'étalement sur boîte de milieu solide contenant les antibiotiques adéquats (Amp ou Tet), permet l'isolement de colonies transformantes c'est-à-dire celles ayant reçu le plasmide contenant un gène de résistance aux antibiotiques.

7.1.2. Protocole de préparation d'E. Coli XL1-Blue

compétentes

- Culture de la souche à 37°C sur milieu solide NZYM + Tet (100 mg/ml) qui sélectionne les cellules contenant l'épisome F'.
- A partir de ces colonies, ensemercer une préculture de 10 ml de NZYM + Tet et incubé 4 heures à 37°C jusqu'à une absorbance comprise entre 1,5 et 2 à 550 nm.
- Cette préculture sert à ensemercer une culture de 100 ml de NZYM + Tet qui est incubée pendant une heure à 37°C , soumise à une forte agitation, jusqu'à une absorbance de 0,3 à 550 nm (phase de croissance exponentielle). ...

- Arrêter la croissance sur glace pendant 10 minutes.
- Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Jeter le surnageant et resuspendre les cellules dans un volume de CaCl₂ 100 mM à 4°C équivalent au 1/10 du volume initial.
- Laisser 30 minutes sur glace.
- Récupérer les bactéries en centrifugeant 5 minutes à 4000 rpm à 4°C.
- Jeter le surnageant et resuspendre dans un volume de CaCl₂ 100 mM stérile et froid / glycérol (85/15) équivalent au 1/100 de volume initial.
- Faire des aliquots de 20 µl dans des eppendorfs et stocker à - 70°C.

7.1.3. Protocole de transformation proprement dite

- Décongeler les bactéries conservées en glycérol dans un eppendorf dans de la glace pilée (1 à 2 minutes).
- Ajouter 380 µl de CaCl₂ froid et stérile.
- Ajouter 1 - 5 µl d'ADN provenant du mélange de ligation et laisser 30 - 60 minutes sur glace pour absorber les molécules d'ADN plasmidique sur les cellules.
- Placer l'eppendorf dans un bain à 42°C et l'y laisser pendant deux minutes, ceci pour faire pénétrer le plasmide dans les cellules.
- Ajouter 1 ml de NZYM liquide et incuber une heure à 37°C pour la phase de récupération.
- Etaler (200 µl) sur boîte avec milieu sélectif et incuber une nuit à 37°C.
- Ce protocole est applicable aussi pour les souches HB101 qui croissent respectivement à 37°C.

7.1.4. Remarque

Des témoins de transformation sont réalisés :

- . Témoin positif : transformer avec un vecteur pour vérifier la compétence des cellules et le taux de transformation.

- . Témoin négatif : les cellules compétentes subissent toutes les étapes de la transformation sans ADN. Elles sont étalées sur milieu riche non sélectif pour le contrôle de la viabilité des cellules et sur un milieu sélectif pour montrer la validité de ce milieu et l'absence de mutants spontanés ou de contaminants résistants à l'antibiotique ou de contaminants.

...

7.2. Transformation bactérienne par Electroporation

7.2.1. Principe

L'intérieur de la membrane bactérienne est chargée négativement. Si on applique un champ électrique, les charges de part et d'autre de la membrane vont augmenter et s'attirer de sorte qu'il se forme des pores. Ensuite, les charges s'annulent et la membrane se reforme, ce sont des pores transitoires.

Ces pores permettront aux protéines ou à l'ADN de pénétrer dans la bactérie.

7.2.2. Protocole de préparation de bactéries compétentes

(XL1 Blue, Hb 101)

- Préculture d'E. Coli XLI-Blue (ou Hb101) dans 10 ml de NZYM, une nuit à 37°C.
- Inoculer 100 ml de milieu NZYM avec 1/100 de volume (1ml) de préculture. Faire pousser à 37°C jusqu'à une D.O. de 0,5 à 0,8 ($\lambda = 600 \text{ nm}$).
- Refroidir la culture sur glace 15 à 30 minutes.
- Centrifuger 20 minutes à 4500 rpm à 4°C.
- Resuspendre le culot bactérien dans un volume d'eau stérile froide équivalent au volume initial de culture (100 ml).
- Centrifuger à 4500 rpm à 4°C pendant 20 minutes.
- Resuspendre le culot bactérien dans un volume d'eau stérile froide équivalent à la moitié du volume initial de culture (50 ml).
- Centrifuger à 4500 rpm à 4°C pendant 20 minutes.
- Resuspendre le culot bactérien dans un volume d'eau stérile froide / 10 % glycérol stérile froid équivalent au 1/50 du volume initial de culture (2 ml).
- Centrifuger à 4500 rpm à 4°C pendant 20 minutes.
- Resuspendre le culot dans un volume d'eau stérile froide/10 % glycérol stérile froid équivalent au 1/10 du volume de resuspension de l'avant-dernière étape (200 μl).

...

7.2.3. Protocole d'électroporation proprement dite

- Mettre la cuvette d'électroporation dans glace (BIORAD).
- Dans un eppendorf : 40 μ l - 60 μ l de cellules
1 à 2 μ l de solution de DNA.
- Mélanger et laisser une minute sur glace.
- Paramètres au niveau de l'électroporateur :
 - Capacité : 25 u F
 - Résistance : 200 ohms
 - Voltage : 2,5 Kv (Voltage optimal).
- Transférer dans la cuvette le contenu de l'eppendorf.
- Pulse.
- Ajouter très vite 1 ml de milieu SOC et resuspendre à la pipette pasteur stérile.
- Transférer dans un eppendorf et laisser à 37°C pendant 1 heure (avec agitation éventuelle).
- Vérifier que la RC soit comprise entre 4 et 5 msec.
- Etaler sur boîte NZYM ampicilline et laisser une nuit à 37°C.

Remarque : Il est nécessaire que la solution d'ADN à électroporer soit nettoyée de ses sels (ou du moins en grande partie), sinon il y a risque d'arcs électriques. Pour ce faire, on utilise le protocole de précipitation de l'ADN (voir point 5 : purification et précipitation d'ADN).

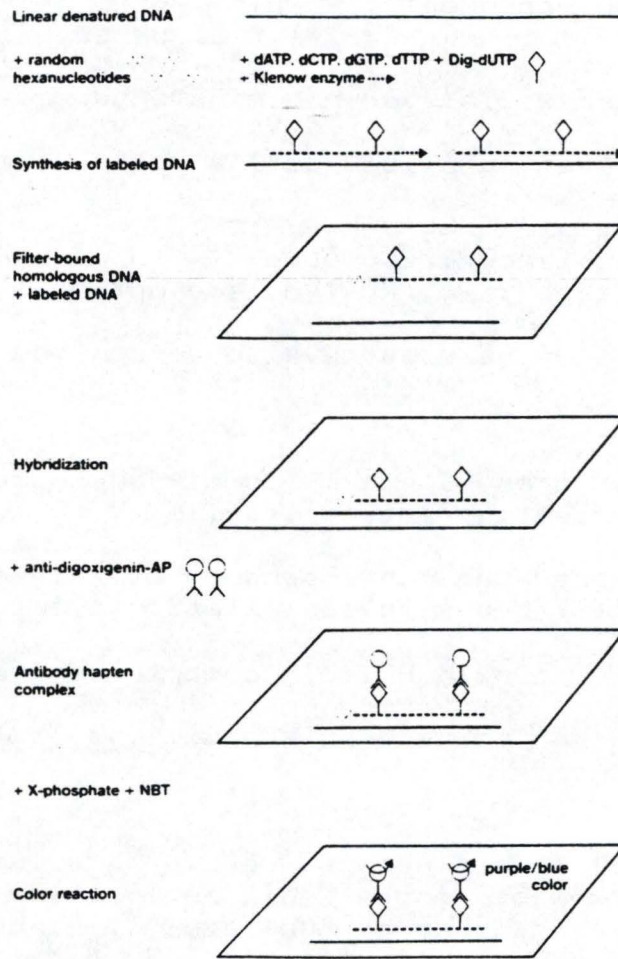


Figure IL10 : Réaction de marquage de l'ADN par la DIGOXYGENINE.

8. SCREENING DES TRANSFORMANTS PAR SONDE MARQUEE A LA DIGOXYGENINE

8.1. Principe du marquage (Kit DIG DNA LABELING,
----- BOEHRIGNER MANNHEIM)

L'ADN est marqué par l'incorporation du complexe digoxygénine couplée au déoxyuridine-triphosphate. Le dUTP est lié via un "bras-spacer" à l'haptène stéroïdien qu'est la digoxygénine (DIG-dUTP). Après hybridation sur l'ADN-cible, les hybrides sont détectés par "enzyme-linked immunoassay" en utilisant un anticorps couplé à la phosphatase alcaline (conjugué antidigoxygénine - phosphatase alcaline) et une réaction colorée catalysée par la phosphatase dont les substrats sont :

- . X-phosphate (5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl phosphate)
- . NBT (nitrobleu tétrazolium)

La méthode de marquage de l'ADN (voir protocole) permet un marquage efficace de petites (10 ng) ou de grandes quantités (3 µg) de DNA.

Il est à noter que l'ADN linéarisé est marqué plus efficacement que l'ADN circulaire. Dans tous les cas, il faudra dénaturer l'ADN par la chaleur avant de procéder au marquage. La réaction est rapide (une heure) et résulte dans l'incorporation du complexe DIG-dUTP tous les 20 - 25 nucléotides au niveau de l'ADN néo-synthétisé (voir figure II.10) cette densité d'haptènes confère une sensibilité élevée au test.

8.2. Tampons et solutions utilisés

- Tampon SSC 20 x NaCl 3N
 NaCitate 0,3M
 Porter à pH 7,5

- Solution de pré-hybridation :

10 ml Denhart's solution
15 ml 20 * SSC
1,6 ml ADN de 5 perme de Saumon 6 mg/ml
0,5 ml de SDS 10 %

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 50 ml.

...

- Solution de Denhart :

Ficoll 5g 5g

Polyvinylpyrrolidone 5g

BSA/pentax Fraction V 5g

Monter jusqu'à 500 ml avec de l'eau distillée.

Filtrer et aliquater. Conserver à - 20°C.

8.3. Protocole de marquage

-
- L'ADN doit être purifié par extraction au phénol-chloroforme et précipité à l'éthanol (voir point 5).
 - Dénaturer l'ADN en le chauffant au bain-marie à 100°C pendant 10 minutes.
 - Ajouter à la solution d'ADN (10 ng - 3 ug) :
 - 2 µl d'hexanucléotide mixture (n° 5)
 - 2 µl de dNTP labeling mixture (n° 6)
 - de l'eau stérile jusqu'à 19 µl de volume final
 - 1 µl d'enzyme KLENOW (n° 7)
- Volume final : 20 µl.
- Centrifuger brièvement (5 secondes) et incuber au moins 1 heure à 37°C. Une incubation plus longue (20 heures) augmentera la quantité d'ADN marqué.
 - Arrêter la réaction en ajoutant 2 µl de solution d'EDTA; 0,2 M; pH 8.0.
 - Précipiter l'ADN marqué avec 2,5 µl LiCl (4M) et 75 µl d'éthanol froid 100 %. Vortexer.
 - Laisser 45' à - 70°C ou une nuit à - 20°C.
 - Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm. Jeter le surnageant.
 - Laver le culot avec de l'éthanol 70 % froid. Sécher sous vide.
 - Resuspendre dans 50 µl d'eau stérile.

...

8.4. Protocole d'hybridation sur boîte de pétri

Utiliser des filtres de nitrocellulose ou des membranes de nylon chargées positivement (BOEHRINGER MANNHEIM).

- Etre en conditions stériles ou sous hotte. Travailler avec gants.
- Faire un répliquat de chaque boîte. Remettre à 37°C une nuit.
- Déposer la membrane sur les colonies et la laisser s'adsorber.
- Retirer la (les) membrane (s) avec les colonies bactériennes adsorbées.

Traiter les filtres successivement dans les solutions suivantes :

- a. SDS 10 % (5 minutes)
 - b. 0,5 M NaOH
1,5 M NaCl (5 minutes)
 - c. 1,5 M NaCl
0,5 M Tris-Cl pH 7,4 (5 minutes)
 - d. 6 * SSC (5 minutes)
 - Sécher à température ambiante 30 minutes.
 - Mettre les filtres 1 - 2 heures à 80°C.
 - Passage dans un bain 30 minutes à 50°C
- SDS 0.5%
SSC 6X
EDTA 1mM pH 8.0
- Incuber trois heures dans la solution d'hybridation à 65°C.
 - Hybridation à 65°C

Jeter la solution d'hybridation et la remplacer par une solution fraîche dans laquelle on ajoute la sonde dénaturée.

On fait bouillir la sonde pendant 10 minutes et sera ensuite ajoutée rapidement à la solution d'hybridation.
Incuber une nuit avec cette solution à 65°C.

- Récupérer la sonde et conserver à - 20°C.

...

8.5. Protocole de lavage et de révélation

8.5.1. Tampons et solutions utilisées

- . Tampon de lavage : buffer 1 + Tween 20
0,3 % (Fluka)
- . Tampon 1 : acide maléique (Fluka) 0,1 M
NaCl (Fluka) 0,15 M
ajuster à pH 7,5.
- . Tampon 2 : Solution stock "blocking" diluée
1 pour 10 dans le buffer 1.
- . Solution stock "blocking" : réactif "blocking"
diluée 10 fois
dans le buffer 1.
A autoclaver et
garder à - 20°C.
- . Tampon 3 : Tris-HCl 0,1 M (Fluka)
NaCl 0,1 M (Fluka)
MgCl₂ 50mM (Fluka)
Ajuster à pH 9,5.
- . Tampon 4 : Tris-HCl (Fluka) 10mM
EDTA (UCB) 1mM
Ajuster à pH 8.0

8.5.2. Technique

- Passage à 65°C dans deux bains consécutifs :
 - 0,1 % SDS - 2 * SSC 500 ml 2x15'
 - 0,1 % SDS - 0,2 * SSC 500 ml 2x5'
- Laver les membranes dans le tampon de lavage pendant 5 minutes à température ambiante.
- Incuber les membranes pendant 30 minutes dans le tampon 2.
- Diluer 10000 fois l'anticorps anti-DIG conjugué à la phosphatase alcaline dans le tampon 2.
- Laver 2 x 15 minutes avec 100 ml de tampon de lavage.
- Equilibrer 2 - 5 minutes dans 20 - 50 ml de tampon 3.

...

- Incuber les membranes avec 10 ml de solution colorée à l'abri de la lumière.

La couleur bleu/pourpre apparaît endéans quelques minutes et la réaction est complète après 16 heures. Ne pas mélanger ou agiter lorsque le signal se développe.

- Lorsque les spots sont apparus, arrêter la réaction en lavant les membranes pendant 5 minutes dans 50 ml de tampon 4.
- Les membranes peuvent être conservées dans le tampon 4 en attendant d'être photographiées.

Méthode 2 (Tampon F) :

- 6'. Resuspendre dans le tampon F.
- 7'. Réaliser quatre cycles de gels/dégels.
- 8'. Soniquer trois fois deux minutes tous les échantillons.
- 9'. Centrifuger dix minutes à 12000 rpm.

10. ELECTROPHORESE UNIDIRECTIONNELLE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE DE SODIUM DODECYLSULFATE (SDS)

10.1. Principe

Cette technique est couramment utilisée pour l'analyse d'un mélange complexe de protéines. Elle permet en effet, la séparation complète sur base du poids moléculaire des divers constituants de l'échantillon déposé au sommet du gel, grâce à la réticulation du gel et au courant qu'on lui applique.

10.1.1. Gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide résulte de la polymérisation de monomères d'acrylamide en longues chaînes pontées avec du méthylène bisacrylamide (HAMES et RICKWOOD, 1981).

La polymérisation est initiée par des catalyseurs produisant des radicaux libres, par exemple le persulfate d'ammonium, le NNN'N' - tétraméthylène diamine (TEMED). La réaction est inhibée en présence d'un excès d'O₂.

La réticulation du gel dépend du pourcentage d'acrylamide et de bisacrylamide mis en présence. La mobilité électrophorétique des protéines diminue si la taille des pores diminue. L'influence de la taille des pores sur la mobilité varie d'une protéine à l'autre car la charge et la taille des molécules interviennent dans la potentialité migratoire. Plus les molécules sont grosses et plus elles sont ralenties par le gel.

10.1.2. SDS - PAGE

Le sodium dodécyl sulfate est un détergent anionique qui a pour propriété de rompre la structure tridimensionnelle des protéines.

...

Quand les protéines sont dénaturées par la chaleur en présence d'un excès de SDS et d'un réducteur des ponts disulfures (β 2-mercaptoéthanol), elles se déroulent et se voient entourées de molécules de SDS à raison de 1,3 à 1,4 g par gramme de protéines de sorte que chaque molécule a la même densité de charges négatives quelle que soit sa charge de départ.

Les protéines ainsi traitées migrent dans un gel de polyacrylamide uniquement en fonction de leur taille.

Le gel de polyacrylamide se compose de deux parties : un running gel ou gel de séparation surmonté d'un stacking gel ou gel d'empilement.

10.2. Solutions utilisées

* Running gel :

0,375 M	Tris HCl	pH 8,8
10 %	acrylamide	
0,27 %	bisacrylamide	
0,1 %	SDS	
0,05 %	Temed	
0,05 %	Persulfate	

* Stacking gel :

0,125 M	Tris Hcl	pH 6,8
3 %	acrylamide	
0,08 %	biscrylamide	
0,1 %	SDS	
0,05 %	Temed	
0,05 %	Persulfate	

Mélange 5 fois concentré :

SDS	(LKB)	10 %
Tris HCl	(Fluka)	250 mM
Meraptoéthanol		10 %
Glycérol	(UCB)	50 %
Bleu de Bromesphénol		0,25 %

Tampon électrophorèse :

Tris	(Fluka)	0,025 M	
Glycine	(UCB)	0,192 M	pH 8,3
SDS	(LKB)	0,1 %	

...

Solution de coloration :

0,25 g bleu de coomasie (brillant blue R50)
45 ml méthanol
45 ml H₂O distillée
10 ml acide acétique glacial

Solution de décoloration :

30 % éthanol T (Merck)
10 % acide acétique glacial (UCB)
60 % H₂O distillée

10.3. Mode opératoire, d'après Laemmli (1970)

10.3.1. Préparation des gels

Les catalyseurs sont ajoutés au dernier moment.

Pendant la polymérisation du running gel, ce dernier est surmonté d'alcool isobutylique pour éviter son contact avec l'O₂.

Le stacking gel (3 %) est ensuite coulé au moment d'insérer le peigne qui moulera les 10 puits.

- Préparation des échantillons :

20 µl de tampon échantillon (voir point 9.1.1).

5 µl de mélange 5x concentré

On fait bouillir l'échantillon 5 minutes.

On déposera 25 à 30 µl par piste de gel.

Parallèlement à ceux-ci, on fait migrer des protéines de poids moléculaire comme (étalon). On fera bouillir également l'étalon 5 minutes.

Remarque : standard de PM utilisé :

Sigma LPM (SDS - 7) :

alpha-lactalbumine	PM 14200
inhibiteur de la trypsine	PM 20100
Trypsinogène	PM 24000

anhydrase carbonique extraite des GR bovins	PM 29000
---	----------

...

glycéraldéhyde - 3 - phosphate D.H.
(lapin) PM 36000

Ovalbumine PM 45000
Albumine bovine PM 66000

10.3.2. Migration

La cuve à électrophorèse est remplie de tampon. Un courant de 200 volts est appliqué pendant 45 minutes. La révélation du gel peut se faire soit par coloration, soit par immunodétection : ce qui implique le transfert sur nitrocellulose.

10.4. Révélation

10.4.1. Coloration au bleu de Coomassie

Décoller prudemment le gel des plaques de verre. Couper le stacking gel ainsi que le bord inférieur gauche (repère du premier puits).

10.4.2. Décoloration

Changer plusieurs fois la solution de décoloration jusqu'à coloration du gel voulue.

10.4.3. Séchage du gel

<p>11. WESTERN BLOTTING (TRANSFERT ELECTROPHORETIQUE SUR NITROCELLULOSE)</p>
--

Après migration électrophorétique, on peut blotter les protéines sur nitrocellulose et dans ce cas, il ne faudra pas colorer le gel.

Le gel est démoulé et mis en contact étroit avec une feuille de nitrocellulose équilibrée dans du tampon transfert, en prenant soin d'éliminer les bulles d'air pour un contact optimal (le tout est coincé entre deux feuilles de papier Wattman).

Le dispositif est immergé dans le tampon transfert et dans le trans-blot cell et soumis à un champ électrique (50 volts pendant 1 h 30').

Après le transfert, la piste étalon est colorée à l'aide d'amidoschwartz pendant une minute. Elle est ensuite décolorée pendant 3 x 10 minutes sous agitation.

Tampon blotting :

Tris 25 mM	(Fluka)	3,03 gr
Glycine 192 mM	(UCB)	14,4 gr
Méthanol T 20 %	(UCB)	200 ml

1 litre d'eau distillée

Composition de l'amidoschwartz 0,1 % :

Amidoschwartz	(Merck)	0,1 gr
Méthanol	(UCB)	45 ml
Ac. Acétique glacial	(UCB)	10 ml
Eau distillée		45 ml

Après blotting, le gel est coloré pour vérifier l'efficacité du transfert. La feuille de nitrocellulose est incubée une heure en PBS 2 % BSA pour saturer les sites restés libres sur la membrane et est lavée ensuite en PBS 1/1000 Tween 20.

Par après, la feuille peut être stockée séchée entre du papier Wattman et dans un sac plastique (à 4°C).

...

12. PROTOCOLE DE REVELATION IMMUNOENZYMATIQUE DES ANTIGENES FIXES SUR NITROCELLULOSE

12.1. Solutions utilisées

PBS 10 x

KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	14,4 g (si Na ₂ HPO ₄ 11,49g)
NaCl	80 g
KCl	2 g
H ₂ O	1000 ml

Mettre à pH 7,4

Hydrolysate de caséine

25 g de caséine pour 800 ml NaOH 0,3 N
1 nuit à 37°C
Porter à PH7 avec HCl concentré
Porter à 1 litre avec de l'eau distillée

Tween PBS 1/1000 : 1 gr de Tween dans 100 ml de PBS 10 fois concentré et porter à 1 litre.

Solution de révélation à l'AEC :

Tampon acétate (*) 0,5 M PH5
H₂O₂ (33 %) 30 l / 10 ml
AEC 5 ml de DMSO (UCB) avec une pastille d'AEC.

Tampon acétate :	Acétate de Na	0,2 M	680 mg
	NaCl		220 mg
	CaCl ₂		7,5 mg
	H ₂ O _d		25 ml

(pH 5)

12.2. Protocole

- Déposer sur la nitrocellulose, un échantillon de lysat bactérien ou viral ou révélation effectuée sur des antigènes blottés sur la feuille de nitrocellulose (WESTERN BLOTTING).
- Saturer dans un bain 50/50 PBS pH7,4 / Hydrolysate de caséine pendant une heure.
- Diluer le ou les différents anticorps dans la solution PBS/Hydrolysate de caséine. ...

- Laver au Tween PBS 1/1000 3 fois 15 minutes.
- Dilution 1/100 du Sheep Anti-Mouse Peroxydase (SAM Perox) dans une solution 50/50 PBS Tween.
- Incuber 1 heure.
- Laver au Tween PBS 1/1000 3 fois 15 minutes.
- Laisser baigner les membranes de nitrocellulose dans la solution de révélation (AEC).
- Conserver à l'abri de la lumière dans un bain d'eau distillée contenant de l'azide de sodium (NaN₃).

13. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

13.1. Principe

Cette technique permet l'amplification de certaines portions de gène. Pour que cela soit possible, les séquences se trouvant de part et d'autre de la région-cible à amplifier doivent être connues. La préparation de DNA doit être dénaturée. Des séquences "primer" de 20 pb complémentaires des sites de chaque côté de la région-cible s'hybrident chacun soit sur le brin "sense" soit sur le brin "anti-sense".

Une DNA polymérase est utilisée pour synthétiser un simple brin d'ADN à partir de l'extrémité 3' - OH de chaque primer.

Le cycle peut ainsi être répété en dénaturant la préparation. Le nombre de copies de la séquence augmente de façon exponentielle. Depuis récemment, on utilise une DNA polymérase provenant d'une bactérie thermophile : l'enzyme reste actif durant toutes les étapes requises pour les cycles dénaturation - renaturation et une séquence donnée peut être amplifiée jusqu'à 4×10^6 fois en 25 cycles.

La longueur de la séquence - cible est déterminée par la distance entre les deux "primers" (limite : +/- 2 kb).

Lors des étapes d'amplification, il peut se produire une erreur de polymérisation toutes les 2.10^4 paires de base.

13.2. Les "primers"

Les primers typiques font généralement 18 à 28 nucléotides de longueur et sont composés à 50 - 60 % de bases G et C.

Il est à noter que la température d'hybridation est inférieure au T_m des primers. Ce T_m est calculé de la façon suivante :

4° C pour les bases G et C
2° C pour les bases A et T
(Thein and Wallace, 1986)

On retirera 1 à 1,5°c par mismatch (voir point 13.3.).

...

Des Tms entre 55° C et 80° C sont exigés. On évitera le fait que les primers aient leur extrémité 3' complémentaires en vue de prévoir la formation de dimères primers. Généralement, les température d'hybridation comprises entre 55°C et 72°C donnent les meilleurs résultats.

13.3. Conditions de clonage des séquences obtenues par PCR

En utilisant deux enzymes telles que PstI et BamHI on rendra le clonage des séquences amplifiées plus efficace. En effet, une seule orientation sera clonée et le vecteur ne pourra pas se refermer sur lui-même.

Les sites de restriction BamHI et PstI seront créés en ajoutant des mismatches du côté 5' du primer, ceci n'ayant aucun effet sur la réaction PCR (MULLIS et AL, 1986; SCHARF et AL, 1986). Lorsqu'on ajoute des séquences à l'extrémité 5' d'un primer en vue de créer le site de restriction, il est important de placer quelques bases (p.c. GG ou CTC) qui permettront la reconnaissance par l'endonucléase.

Si on veut créer un site de restriction plus interne au primer, il faudra que les changements de séquences soient fait le plus près possible de l'extrémité 5'. Ceci, de façon à éviter un mismatch entre le primer et l'ADN au niveau de l'extrémité 3' qui est le point de départ de l'amplification.

13.4. Conditions de réaction et nombre de cycles (BOEHRINGER)

50 mM KCl
10 mM Tris-HCl (pH 8.8)
1,5 mM MgCl₂

100 mg/ml de gélatine
50 mM de chaque dNTP
20 à 50 pmol de primer amont
20 à 50 pmol de primer aval

2,5 unités de Taq DNA polymérase (BOEHRINGER)

100 ng à 1 µg d'ADN génomique

Porter à un volume final de 100 µl avec de
l'eau distillée.

Recouvrir de glycérol (75 µl)

Cycle de la réaction :

30 secondes à 94°C (dénaturer le DNA)

30 secondes à 55°C (hybridation primer-DNA)

30 secondes à 72°C (extension)

. 72°C est la température d'extension à
partir des primers.

. 26 à 28 cycles sont généralement suffisant
pour produire assez d'ADN en vue du clonage.

13.5. Purification des séquences amplifiées

Il est nécessaire de purifier les séquences
amplifiées car les dNTP's sont des inhibiteurs
compétitifs de l'ATP lors de la réaction de
ligation.

13.5.1. Solutions utilisées

Tampon de purification : 50 mM KCl
10 mM Tris-HCl
(pH 8.8 à 25°C)
1,5 mM MgCl₂
0,1 % Triton X-100

Solution de lavage : 80% d'isopropanol

...

13.5.2. Protocole de purification (Kit Magic PCR

PREPS DNA purification system for rapid

purification of DNA fragments)

- Pour chaque réaction PCR, transférer la phase aqueuse dans un eppendorf propre stérile. La présence de glycérol peut entraîner une diminution du rendement de purification.
- Aliquoter 100µl de "Direct Purification Buffer" dans un eppendorf (1,5 ml). Ajouter 30 - 300 µl de la réaction PCR.
Vortexer pour mélanger.
- Ajouter 1 ml de résine "Magic Prep" et vortexer 3 fois pendant une période d'une minute.
- Pour chaque produit PCR, préparer une "Magic" minicolonne. Retirer le piston d'une seringue de 3 ml et attacher le corps de celle-ci à la minicolonne.
- Pipeter le mélange résine/ADN (2ème étape) dans la seringue. Insérer le piston et pousser très doucement et très lentement de façon à faire passer le liquide dans la colonne.
- Détacher la seringue de la minicolonne et retirer le piston. Réajuster le corps de la seringue à la minicolonne. Ajouter 2 ml de solution "Column Wash" (Lavage) dans la seringue. Remettre le piston et pousser très lentement.
- Retirer la seringue et transférer la minicolonne sur un eppendorf. Centrifuger le tout 20 secondes à 12000 rpm pour sécher la résine.
- Transférer la minicolonne sur un nouvel eppendorf. Ajouter sur la minicolonne 50 µl d'eau distillée et attendre 1 minute. Centrifuger la minicolonne pendant 20 secondes à 12000 rpm pour éluer le fragment d'ADN attaché.
- Retirer la minicolonne. L'ADN purifié peut être conservé à 4°C ou - 20°C.

...

* On estime le rendement de la purification à :

60 %	pour une taille de fragment d'ADN de 3200 pb
96 %	1500 pb
99 %	300 pb
69 %	200 pb
3 %	75 pb
2 %	50 pb

BUT DU TRAVAIL

La prophylaxie médicale de l'affectation au BRSV repose à l'heure actuelle sur l'utilisation de vaccins vivants atténués. Ces vaccins peu efficaces n'induisent malheureusement qu'une immunité de courte durée (de l'ordre de 4 mois) de sorte que des revaccinations fréquentes sont nécessaires pour protéger correctement le cheptel. Dans ce contexte, un vaccin de nouvelle génération hautement immunogène serait plus utile. En ce qui concerne l'affectation au HRSV (Human Respiratory Syncytial Virus), aucun vaccin efficace n'a encore été mis au point.

Différentes protéines du virus syncytial bovin (G, F, N et 22 K) peuvent conférer une réponse protectrice mais accompagnée de problèmes immunopathologiques. Ainsi, les protéines N et 22K, riches en épitopes T, orientent plutôt une réponse cellulaire tandis que les protéines F et G, contenant plus d'épitopes B, préconisent une réponse humorale. Ces deux dernières protéines induisent la production d'anticorps neutralisants mais aussi d'anticorps non-neutralisants, ces derniers étant (selon certains auteurs) associés à des lésions pathologiques. On sait ainsi que les protéines F et G injectées à des animaux de laboratoire confèrent une protection efficace à l'égard du BRSV.

Il est donc de haute importance de pouvoir localiser les épitopes B qui induisent uniquement l'apparition d'anticorps neutralisants et de produire en quantité suffisante les fragments porteurs d'épitopes intéressants. C'est pourquoi, notre travail s'est focalisé sur la protéine F qui est la plus immunogène et qui, de plus, présente moins de variabilité antigénique que la protéine G. Nous essayerons dès lors, de localiser les épitopes B portés par la protéine F, capables d'induire une réponse neutralisante. Ceci sera rendu possible grâce au clonage de fragments de séquence du gène F ne recouvrant idéalement qu'un seul épitope B. Ceux-ci seront clonés dans un vecteur d'expression afin de les obtenir en grande quantité. Les fragments de la glycoprotéine F du BRSV obtenus seront caractérisés par une batterie d'anticorps monoclonaux anti-F préalablement typés au laboratoire.

RESULTATS

1. Stratégie
2. Clonage
 - 2.1. Clonage de la protéine de fusion F du BRSV dans le vecteur d'expression pMAL-cRI
 - 2.1.1. Extraction de l'ADN plasmidique
 - 2.1.2. Restriction de vérification
 - 2.1.3. Extraction du gène F du plasmide recombinant pSK+-F
 - 2.1.4. Récupération du gène F
 - 2.2. Préparation du plasmide pMAL-cRI
 - 2.2.1. Restriction par Pst I
 - 2.2.2. Filling
 - 2.2.3. Restriction par BamHI
 - 2.2.4. Récupération de la bande relative au plasmide pMAL - cRI préparé
 - 2.3. Clonage du gène F dans le plasmide pMAL - cRI
 - 2.4. Transformation et identification des clones
 - 2.5. Restriction de vérification
 - 2.6. Expression de la protéine F sous forme de protéine de fusion
 - 2.6.1. Cinétique de la production de la protéine de fusion
 - 2.6.1.1. Expression
 - 2.6.1.2. Test de l'expression : DOT BLOT
 - 2.6.2. Caractérisation de la protéine produite
 - A. Electrophorèse en gel SDS - PAGE et Western Blotting
 - A.1. Révélation au bleu de Coomassie
 - A.2. Révélation à l'anticorps monoclonal AK13A2

...

3. Vérification de la reconnaissance des anticorps anti-F sur la protéine dénaturée
 - 3.1. Caractérisation des anticorps fonctionnant en SDS
 - 3.1.A. Motifs de la caractérisation
 - 3.1.B. Caractérisation proprement dite
 - 3.2. Mise au point du test des différents anticorps sur des lysats de bactéries recombinantes pMAL - cRI - F et non-recombinantes pMAL - cRI
4. Préparation de fragments de séquence du gène F obtenus par PCR et par digestion séquentielle
 - 4.1. But et stratégie du clonage
 - 4.1.1. Fragments obtenus par PCR
 - 4.1.2. Fragments obtenus par digestion séquentielle
 - 4.1.3. Utilité des protéines tronquées obtenues
 - 4.2. Préparation des fragments PCR
 - 4.3. Préparation des différents fragments obtenus par digestion séquentielle
5. Préparation du vecteur pMAL - cRI
 - 5.1. Préparation du vecteur pour le clonage des fragments et du morceau de 1300 pb
 - 5.1.1. Préparation du plasmide pMAL - cRI
 - 5.1.2. Préparation par PstI - KLENOW - EcoRI
 - A. Restriction par PstI
 - B. Filling
 - C. Restriction par EcoRI
 - 5.1.3. Préparation par EcoRI
 - 5.1.4. Récupération des band
 - 5.1.5. En résumé
 - 5.2. Préparation du vecteur pour le clonage des fragments obtenus par PCR
 - 5.2.1. Préparation du plasmide pMAL - cRI
 - A. Restriction par BamHI
 - B. Restriction par PstI
 - C. Récupération de bande

6. Mise au point d'une sonde F marquée à la DIGOXYGENINE

6.1. But de la mise au point de la sonde

6.2. Marquage de la sonde F

6.2.1. Restriction par EcoRI

6.2.2. Récupération des bandes de 700 à 1300 pb

6.2.3. Marquage de l'ADN à la DIGOXYGENINE

6.2.4. Vérification de la sp

6.3. Vérification de la spécificité de la sonde

A. Dot. Blot de différents échantillons

B. Résultats

7. Problèmes de clonage

7.1. Clonage des différents fragments obtenus par digestion séquentielle

7.1.1. Problèmes rencontrés

7.1.1.A. Mauvaise préparation du plasmide

7.1.1.B. Clonage difficile

7.2. Clonage des fragments obtenus par PCR

7.2.1. Problèmes rencontrés

7.2.1.A. Clonage sans purification de l'ADN

7.2.1.B. Extraction au phénol

7.2.1.C. Clonage avec purification

7.2.1.D. Clonage après purification et extraction au phénol

7.2.2. Questions et solutions envisagées

RESULTATS

1. STRATEGIE

Dans un premier temps, nous réaliserons le clonage du gène de la protéine de fusion (F) du BRSV dans un vecteur d'expression : pMAL - CRI. Celle-ci sera exprimée sous la forme d'une protéine de fusion Maltose Binding Protein - Protéine F (MBP - F), dans le but de tester des anticorps monoclonaux sur des lysats de bactéries recombinants pMAL - CRI - F. Il faudra donc d'une part, définir les anticorps monoclonaux réactionnels en conditions dénaturantes et d'autre part, mettre au point les tests de détection par les anticorps monoclonaux de la protéine de fusion exprimée en pMAL - CRI.

En parallèle, nous essayerons de cloner dans le vecteur pMAL-CRI différents fragments de la séquence du gène F obtenus par PCR (Polymérase Chain Reaction) et par digestion séquentielle (Exonucléase III).

La production de ces différents fragments de la protéine F (protéines tronquées) permettra de tester les anticorps monoclonaux déjà typés. La réactivité des différents anticorps monoclonaux vis-à-vis des différents peptides permettra la localisation d'épitopes B continus au niveau de la protéine F.

Figure III.1 : Séquence nucléotidique d'un gène de la protéine de fusion de la souche RB94 du BRSV. Séquence déduite en acides aminés. Comparaison de ces séquences avec celles des souches A et B (RSS-2 et 18537) du HuRSV. Seuls les nucléotides et les acides aminés variants sont spécifiés.

La flèche montre le site de clivage entre F2 et F1. Le peptide signal et le domaine d'ancrage à la membrane sont soulignés.

Les sites potentiels de glycosylation sont encadrés.

Les résidus cystéine communs aux 3 protéines sont indiqués par des triangles noirs.

Les numéros indiqués donnent la position des nucléotides et des acides aminés

2. CLONAGE

2. Clonage de la protéine de fusion F du BRSV dans le vecteur d'expression pMAL - CRI

2.1. Extraction du gène F du plasmide pBluescript KS+

Le gène de la protéine de fusion F (figure III.1) dont nous disposions pour démarrer le travail était inséré dans le vecteur pBluescript SK+(figure III.2). De part l'insertion du gène de longueur d'environ 1,9 kb, la taille du plasmide contenant l'insert est augmentée à environ 5 kb. Le plasmide recombinant pKS+ - F a été transformé dans la souche XL1 - Blue.

2.1.1. Extraction de l'ADN plasmidique

Dans un premier temps, nous avons extrait le plasmide recombinant de la souche XL1 - Blue par MIDIPREP QIAGEN(figure III.3). L'ADN de MIDIPREP a été resuspendu dans 30 µl d'eau distillée stérile et nous en avons prélevé un échantillon(1/10, 3µl) pour une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %. Ceci nous a permis d'évaluer la quantité d'ADN extraite : 20 - 24 µg d'ADN .

2.1.2. Restriction de vérification

Le gène de la protéine de fusion F a été inséré au niveau du site EcoRI du plasmide pSK+ et de plus, le gène F possède également un site EcoRI (voir figure III. 2).

Nous avons donc restreint 500 ng de plasmide recombinant par 5 unités d'enzyme EcoRI en présence de tampon H, 2 heures à 37°C. Le plasmide a donc été linéarisé et l'insert excisé en 2 fragments.

Nous avons obtenu le pattern caractéristique c'est-à-dire le plasmide à 3 kb et les fragments du gène de la protéine F d'environ 700 pb et d'environ 1300 pb (figure III. 3).

...

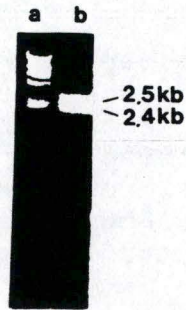


Figure III.4 : Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide recombinant pBluescript-F restreint par *Pvu* II.
 Piste a : marqueur λ restreint par *Hind* III .
 Piste b : pBluescript-F restreint par *Pvu* II.

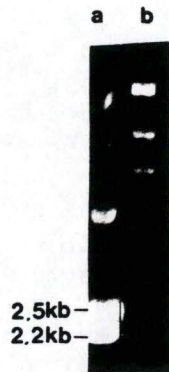


Figure III.5 : Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide pBluescript-F restreint par *Bam* HI (avec restriction préalable par *Pvu* II).
 Piste a : pBluescript-F restreint par *Bam* HI
 Piste b : marqueur λ restreint par *Hind* III .

2.1.3. Extraction du gène F du plasmide recombinant

pSK+ - F

- Nous disposons du plasmide recombinant pKS+ - F en quantité, nous pouvons envisager l'extraction du gène F entier.

Il faut savoir que le gène doit être extrait de sorte que les cadres de lecture du gène Mal E du plasmide pMAL-cRI et du gène F soient en phase. Cette construction permettra la synthèse de la protéine F sous forme de protéine de fusion Maltose Binding Protein - F.

- Nous avons donc procédé à une première digestion de 5 ug de plasmide recombinant par 10 Unités de l'enzyme PvuII dans du tampon M pendant 2 heures à 37°C.

Un échantillon est prélevé et soumis à une électrophorèse. L'observation du gel d'agarose sous UV montre deux bandes de 2,4 kb et de 2,5kb (voir figure III.4).

Ceci s'explique par le fait que le pKS+ possède deux sites PvuII en amont et en aval du MCS aux positions 527 et 972 (voir carte du pBluescript KS+, matériel et méthodes).

Une seconde digestion a été effectuée après une extraction au phénol - chloroforme et d'une précipitation. Cette digestion par l'enzyme de restriction BamHI permet d'enlever une partie de la séquence du pSK+ restée attachée au gène F. L'observation d'un échantillon sous UV nous montre le gène F aux environs de 2,2 Kb (F + quelques pb de pSK+) juste en-dessous de la bande correspondant au vecteur (2.5 kb) (voir figure III.5).

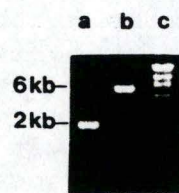


Figure III.6 : Electrophorèse sur gel d'agarose de bandes correspondant au gène F après récupération par GENE CLEAN.
 Piste a : Gène F restreint par *Pvu* II et *Bam* HI
 Piste b : pMAL-cRI préparé Pst I Klenow-*Bam* HI
 Piste c : marqueur λ restreint par *Hind* III .

2.1.4. Récupération du gène F

La totalité du mélange de restriction final est déposé sur un gel d'agarose en vue d'une séparation par électrophorèse. Le DNA est récupéré par la méthode du kit GENE CLEAN . L'observation sous UV d'un échantillon indique que nous disposons d'un peu plus de 5 µg de matériel (figure III.6).

2.2. Préparation du plasmide pMAL - cRI

Le gène F issu du plasmide recombinant pSK+ - F présente une extrémité blunt (à bouts francs) engendrée par la restriction par PvuII et une extrémité protrudante due à la restriction par BamHI.

Il est donc nécessaire de :

1. Rendre blunt une extrémité du plasmide linéarisé et avoir une extrémité protrudante donnée par restriction BamHI.
2. Trouver les sites de restriction adéquats au niveau du site multiple de clonage du plasmide pMAL-cRI autorisant la fusion des séquences de F et de la MBP.

2.2.1. Restriction par Pst I

Environ 10 µg de plasmide pMAL-cRI ont été restreints par 10 Unités d'enzyme PstI.

L'ADN plasmidique a ensuite été purifié par une extraction au phénol suivie d'une précipitation à l'éthanol.

2.2.2. Filling

Le plasmide pMAL - cRI, restreint, est soumis à l'action du fragment Klenow de l'ADN polymérase, celui-ci enlève les nucléotides de l'extrémité 3' protrudante engendrée par restriction PstI.

Après une heure d'incubation, à 14°C, l'enzyme a été dénaturée puis extraite au phénol. L'ADN a ensuite été précipité à l'éthanol .

L'électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %) d'un échantillon du plasmide suivie de l'observation sous UV indique que l'ADN n'a pas subi de dégradations.

2.2.3. Restriction par BamHI

Le plasmide linéarisé a ensuite été restreint par 10 Unités d'enzyme BamHI.

2.2.4. Récupération de la bande relative au plasmide

pMAL - cRI préparé

La totalité du mélange de restriction final a été déposé sur gel d'agarose 0.8 % .

La récupération de la bande a été effectuée avec le kit GENE CLEAN (Bio 101).

Un échantillon a été soumis à une électrophorèse en gel d'agarose.

L'observation sous UV nous indique que nous avons récupéré environs 6 µg de plasmide préparé (figure III.6).

2.3. Clonage du gène F dans le plasmide pMAL - cRI

Nous avons mis en présence 100 ng de plasmide et 2 µg d'insert F et ajouté à ce mélange une unité de T4 DNA ligase dans du tampon de ligation. La réaction a été effectuée pendant une nuit à 16°C.

L'excès d'insert par rapport aux molécules de plasmide optimise le pourcentage de réussite de la ligation.



Figure III.7 : Electrophorèse sur gel d'agarose de la restriction par *Eco* RI de 10 clones transformants issus de la ligation entre pMAL-cRI et le gène F.
 Piste d : plasmide recombinant pMAL-cRI-F restreint par *Eco* RI correspondant à la construction recherchée
 Piste g : marqueur λ restreint par *Hind* III

2.4. Transformation et identification des clones

Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer des cellules HB101 compétentes. Ces cellules ont été étalées sur milieu sélectif NZYM+Amp. Les colonies transformantes apparaissent après 12 à 14 heures d'incubation à 37°C. Parmi celles-ci, 10 ont été choisies pour ensemercer chacune un milieu liquide NZYM ampicilline sélectif.

Après une nuit d'incubation à 37°C, un ml de chaque culture est prélevé et est utilisé pour l'extraction rapide d'ADN plasmidique (miniprep). Une fraction de chaque préparation d'ADN a été restreinte par 5 unités d'EcoRI. Les fragments issus de chaque restriction ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %) et leur taille évaluée, ce qui permet d'identifier la ou les bactérie(s) possédant le plasmide recombinant.

Nous avons ainsi isolé un clone contenant trois fragments de restriction EcoRI : les tailles de ces fragments sont 6,1kb; 1,3kb et 0,7kb (figure III.7).

Ces trois fragments sont les suivants suivants :

- Le plasmide pMAL-cRI possédant un site EcoRI en amont du site BamHI dans le MCS et le gène F possédant, lui aussi, un site EcoRI interne à sa séquence et deux autres sites EcoRI à ses extrémités. La restriction par l'enzyme EcoRI libérera trois fragments. L'un d'entre eux étant le plasmide libéré de son insert (6,1kb). Le gène F, quant à lui, a été scindé en deux fragments d'environ 700 et 1300 pb.

2.5. Restriction de vérification

Puisque l'orientation du clonage est forcée, le gène F ne peut être que dans la bonne direction (coté 5' du coté du promoteur du gène malE). Cependant, nous avons voulu vérifier la parfaite insertion du gène de la protéine F dans le site de clonage du vecteur pMAL-cRI. En aval du site BamHI, (au niveau de la séquence du plasmide pSK+ restée accolée au gène F, se trouve un site SmaI et un site SacI est présent en amont du site Kpn I du vecteur pMAL-cRI (voir matériel et méthode, site MCS du vecteur pMAL-cRI).

Si le gène F est inséré correctement, la double restriction Sma I - Sac I ne libérera qu'un fragment d'environ 60 pb qui sera pratiquement "invisible" sur gel d'agarose. On aura l'impression d'avoir linéarisé le plasmide recombinant .

...

Dans le cas contraire, si le gène F est mal orienté, la taille du fragment obtenu par double digestion sera beaucoup plus élevée (environ 2 kb).

Un échantillon du mélange de restriction par PstI et SmaI a été prélevé et soumis à une électrophorèse.

L'observation sous UV présente l'image d'une bonne insertion du gène F dans le plasmide d'expression.

2.6. Expression de la protéine F sous forme de protéine de fusion

2.6.1. Cinétique de la production de la protéine de fusion

2.6.1.1. Expression

Nous avons lancé une culture de bactéries transformées par le plasmide pMAL-cRI et en parallèle une culture de bactéries recombinantes transformées par le plasmide pMAL-cRI dans 25 ml de milieu sélectif NZIM ampicilline. on a laissé pousser une nuit à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O. de 0.4 ($\lambda = 600 \text{ nm}$).

Un aliquote de bactéries a été prélevé (1 ml) et centrifugé à 12000 rpm pendant 3 minutes. Le surnageant a été écarté et les cellules ont été resuspendues dans 100 μl de tampon de lyse Laemmli (ceci pour les deux candidats positif et négatif). Cet échantillon est appelé T0.

Nous avons ensuite ajouté aux deux cultures 240 μl d'IPTG 100 mM (incubation à 37°C). Des prélèvements après une heure, deux heures et trois heures sont effectués et lysés dans le tampon de Laemmli. Ces échantillons sont appelés T1, T2 et T3.

...

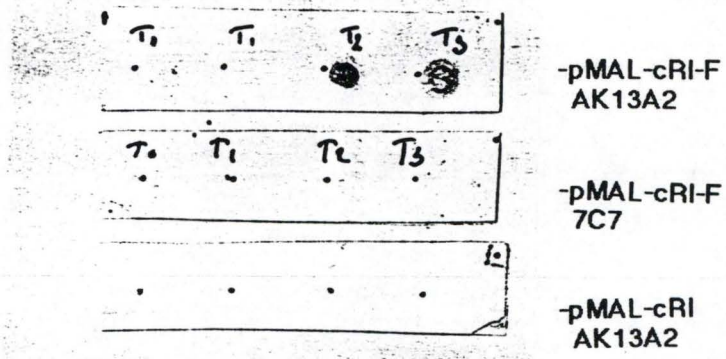


Figure III.8 : Résultat du Dot blot des échantillons T0, T1, T2, T3 provenant de lysats de bactéries recombinantes pMAL-cRI-F et non recombinantes pMAL-cRI détectés à l'aide des anticorps monoclonaux AK13A2 (anticorps anti-protéine de fusion) et 7C7 (anticorps-témoin).

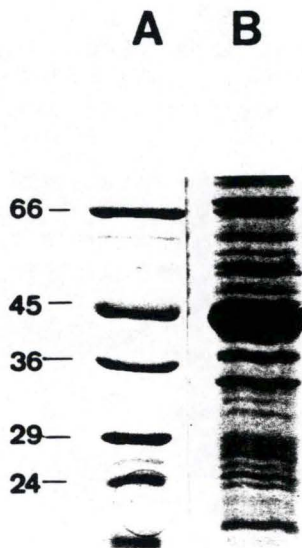


Figure III.9 : Gel SDS-PAGE de lysats bactériens recombinants pMAL-cRI-F (méthode 1) coloré au bleu de Coomassie.

Piste a : Etalons de poids moléculaire, leur taille est exprimée en kilodaltons (kD).

Piste b : pMAL-cRI-F

2.6.1.2. Test de l'expression : Dot Blot

Le but de cette manipulation est de vérifier si le clone bactérien contenant le vecteur pMAL-cRI exprime bien la protéine F. De plus, nous avons analysé la cinétique de l'expression de F s'étalant sur trois heures.

Nous avons utilisé les anticorps monoclonaux AK13A2 et 7C7. AK13A2 est un anticorps spécifique de la protéine F (plus précisément de la sous-unité F1). Tandis que 7C7 (anti-MHC de classe II bovin) nous a servi de contrôle négatif.

5 x 2 ul de chaque échantillon (T0, T1, T2, T3) est déposé sur une bande de nitrocellulose. Au total, nous disposerons de quatre bandelettes :

- deux bandelettes de lysat pMAL-cRI révélées chacune soit par AK13A2 soit par 7C7.
- deux bandelettes de témoin négatif révélées chacune soit par AK13A2 soit par 7C7.

La révélation à l'AEC nous montre que la protéine F est synthétisée au niveau du candidat positif, l'anticorps AK13A2 donnant un signal positif (A : T2 et T3, figure III.8).

En ce qui concerne le candidat négatif, la révélation par AK13A2 donne un signal négatif, de même pour la révélation à l'anticorps 7C7 (B : figure 8). Ces résultats témoignent de la spécificité de l'expression de F par notre clone positif.

Signalons enfin que nous n'avons pas cherché à optimiser l'expression. Nous estimons qu'au temps T3, le niveau d'expression était suffisamment élevé pour pouvoir obtenir la protéine de fusion en quantité adéquate pour les tests immunologiques ultérieurs. Nous nous sommes contentés ici de suivre les recommandations de la firme BIOLABS qui commercialise ce vecteur.

2.6.2. Caractérisation de la protéine produite

2.6.2.A. Electrophorèse en gel SDS - PAGE et Western Blotting

Afin d'aborder l'étude du processing de la protéine F dans notre système d'expression, les lysats (par méthode 1 et 2, voir matériel et méthode) du temps 3 (T3) du clone portant le

...

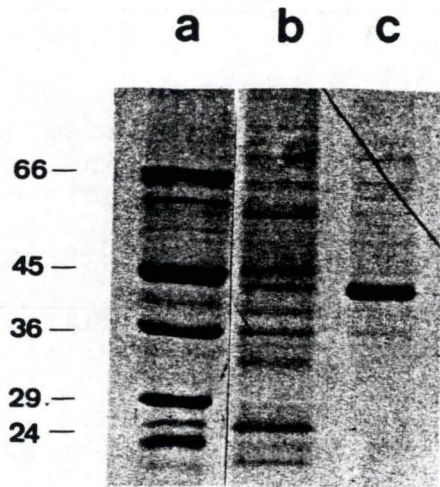


Figure III.10 :Gel SDS-PAGE de lysats bactériens recombinants pMAL-cRI-F et non recombinants pMAL-cRI (méthode 2) coloré au bleu de Coomassie.

Piste a : Etalons de poids moléculaire, leur taille est exprimée en kilodaltons (kD).

Piste b : pMAL-cRI

Piste c : pMAL-cRI-F

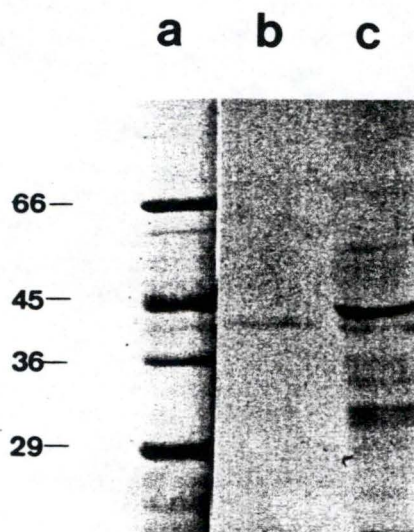


Figure III.11 :Résultats de Western blotting obtenus à l'aide de l'anticorps AK13A2 à partir de lysats bactériens (méthode 1)

Piste a : Etalons de poids moléculaire, leur taille est exprimée en kilodaltons (kD).

Piste b : pMAL-cRI

Piste c : pMAL-cRI-F

plasmide recombinant (pMAL - cRI) et préparé en SDS est soumis à une électrophorèse en gel SDS - PAGE. Un premier gel sera révélé au bleu de Coomassie et un second avec les mêmes échantillons sera blotté sur feuille de nitrocellulose pour la révélation à l'anticorps monoclonal AK13A2 (anti-sous-unité F1).

A.1. Révélation au bleu de Coomassie

La piste de lysat de bactéries recombinantes pMAL-cRI-F présente une bande majoritaire aux environs de 40 kD (figure III). Or, la protéine de fusion MBP-F a une masse moléculaire attendue aux environs de 100 kD. Séparément, la MBP comme F, sont attendues aux environs de 40 kD alors que F2 se situerait aux environs de 12 kD.

A.2. Révélation à l'anticorps monoclonal AK13A2

On observe ici que l'anticorps monoclonal AK13A2 reconnaît spécifiquement (si l'on compare avec un lysat témoin) une bande aux environs de 40 kD. Sachant qu'AK13A2 est spécifique de la sous-unité F1 de la protéine F, il semble que la protéine de fusion MBP-F aie été clivée par des protéases de E. Coli au cours de l'expression. Nous avons donc l'expression de trois sous-unités séparées F1, MBP et F2, seul F1 et MBP ont pu être caractérisés et semblent intacts car de leur masse moléculaire correspond à celle attendue. De plus, la sous-unité F2 semble également clivée de F1 et de la MBP. Cependant, nous n'avons pu la localiser actuellement.

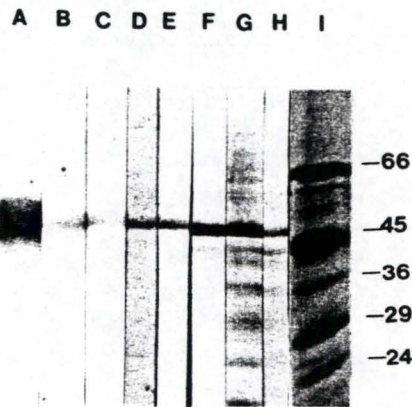


Figure III.12 :Résultats de Western blotting obtenus à l'aide des anticorps monoclonaux AK13A2 (piste A), AL13D12 (piste B), AL17B3 (piste C), AL15H16 (piste D), AL4B2 (piste E), AL11C2(piste F), AL11H6 (piste G), AK4F6 (piste H), à partir de lysat de cellules Véro infectées par du BRSV.

Dans la piste I migrent des étalons de poids moléculaires, leur taille est exprimées en kilodaltons (kD)

3. SELECTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX RECONNAISSANT LA PROTEINE F DENATUREE

3.1. Caractérisation des anticorps reconnaissant la protéine F en présence de SDS

3.1.A. Justification

- a) La plupart des anticorps monoclonaux anti-F décrits jusqu'ici pour le HRSV reconnaissent la sous-unité F1. Nous avons dès lors pour des raisons de stratégie, concentré nos efforts sur le clonage et l'expression de fragments de gène recouvrant des séquences de cette sous-unité F1. La vérification de la reconnaissance de la sous-unité F1 par les anticorps monoclonaux anti-F dont nous disposons se pose donc en préalable essentiel.
- b) La protéine F étant exprimée sous la forme d'une protéine de fusion, il est probable que celle-ci n'ait pas la même conformation que la protéine native. Il faut donc sélectionner des anticorps qui ne reconnaissent qu'une zone continue de la séquence et non des motifs structurels et conformationnels. Le même problème se posera lors du clonage de fragments de séquences du gène F. De plus, nous travaillerons en présence de SDS pour des raisons pratiques : cette lyse est facile et dans ces conditions, il y a solubilisation de la protéine recombinante.

3.1.b. Caractérisation proprement dite

Un échantillon de surnageant viral (de BRSV) resuspendu en SDS a été soumis à une électrophorèse en gel SDS-PAGE 12% en condition réductrice ou non (β -mercaptoéthanol ajouté ou non). Le β -mercaptoéthanol réduit les ponts disulfures unissant les sous-unités F1 et F2 de la protéine F. Dans un premier temps, nous avons procédé un transfert sur nitrocellulose suivi du test des différents anticorps monoclonaux anti-F (figure III.12).

Sur 12 anticorps monoclonaux anti-F testés, huit d'entre eux reconnaissent une bande située aux environs de 48 kD correspondant à la sous-unité F1 de la protéine F.

Il s'agit de : AK13A2, AL13D12, AL17B3, AL15H6, AL4B2, AL11C2, AL11H6, AK4F6.

En outre, J.P. Matheise a caractérisé ces différents anticorps en neutralisation. AK13A2 est un anticorps très neutralisant, AL13D12 et AL17B3 sont deux anticorps faiblement neutralisants. Les autres anticorps n'ont pas d'activité neutralisante.

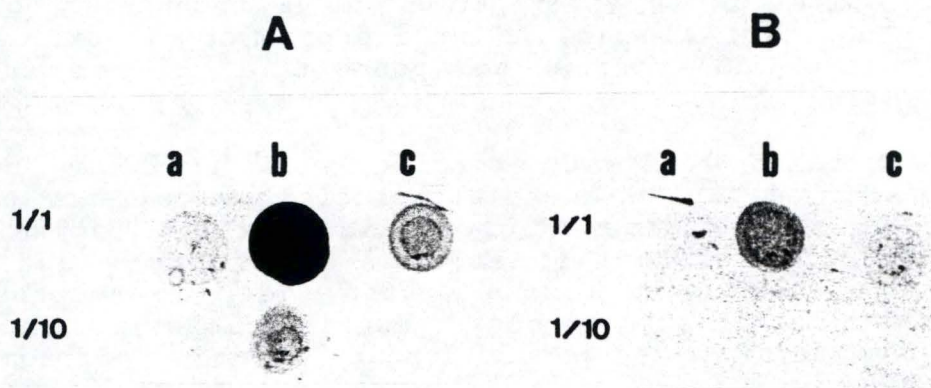


Figure III.13 : Dot blot de lysats de bactéries recombinantes pMAL-cRI-F et non recombinantes pMAL-cRI.

A. Lyse par la méthode 1

a : pMAL-cRI
 b : pMAL-cRI-F
 c : témoin virus

B. Lyse par la méthode 2

a : pMAL-cRI
 b : pMAL-cRI-F
 c : témoin virus

3.2. Mise au point du test des différents anticorps sur des lysats de bactéries recombinantes pMAL-cRI-F

3.2.1. Analyse de la réactivité des anticorps monoclonaux sur lysat SDS de bactéries recombinantes

Dans un premier temps, nous avons testé les anticorps monoclonaux sur un lysat SDS des bactéries recombinantes.

Nous disposons donc de huit anticorps reconnaissant certains épitopes continus de la protéine F. Nous les avons testés avec la protéine de fusion MBP-F exprimé par les bactérie recombinantes lysées.

Différents échantillons de lysats bactériens ont été déposés sur feuille de nitrocellulose et les anticorps ont été testés en dilutions croissantes : 10/100/1000.

Nous avons obtenu les résultats suivants : seul AK13A2 donne un signal positif très spécifique (même à forte dilution). Les autres anticorps ne donnent rien si ce n'est un bruit de fond dont l'intensité diminue avec la dilution (à la dilution 1/1000, la réaction est nulle) (figure III.13).

En fait, nous travaillons avec du liquide d'ascite contenant vraisemblablement des anticorps anti-coli qui pourraient être responsables du bruit de fond. Ce bruit de fond diminue si la dilution augmente (anticorps anti-coli diminué). Mais celle-ci empêche la réaction Ag-Ac spécifique (anticorps de faible affinité dilués). Seuls les anticorps d'affinité suffisante donneront un signal positif (comme AK13A2).

3.2.2 Lyse des bactéries recombinantes par la seconde méthode

Puisque seul AK13A2 reconnaît spécifiquement la protéine dans un lysat SDS d'E.coli recombinant, il nous faudra procéder autrement pour tester les autres anticorps.

Nous avons donc procédé à une lyse des bactéries recombinantes par une méthode permettant la solubilisation de l'antigène recombinant et son utilisation dans des tests Elisa et/ou des manipulations de purifications (colonne d'anticorps pour F1, colonne d'amylose sur les fragments de F s'ils ne sont non clivés).

Après lyse des bactéries par la seconde méthode, 2 μ l de lysat fut blotté sur nitrocellulose conjointement à un lysat d'E.coli témoin (figure III.13). La révélation par l'anticorps monoclonal AK13A2 montre que la solubilisation est satisfaisante (figure III.13). Un gel SDS-PAGE coloré au bleu de coomasie montre que la protéine ainsi solubilisée présente le même pattern de bandes que celui observé sur un lysat SDS d'E. coli recombinants (figure III.10)

Des tests de purification et l'analyse de la réactivité des anticorps monoclonaux à l'aide de ce lysat d'E. coli recombinants sont en cours.

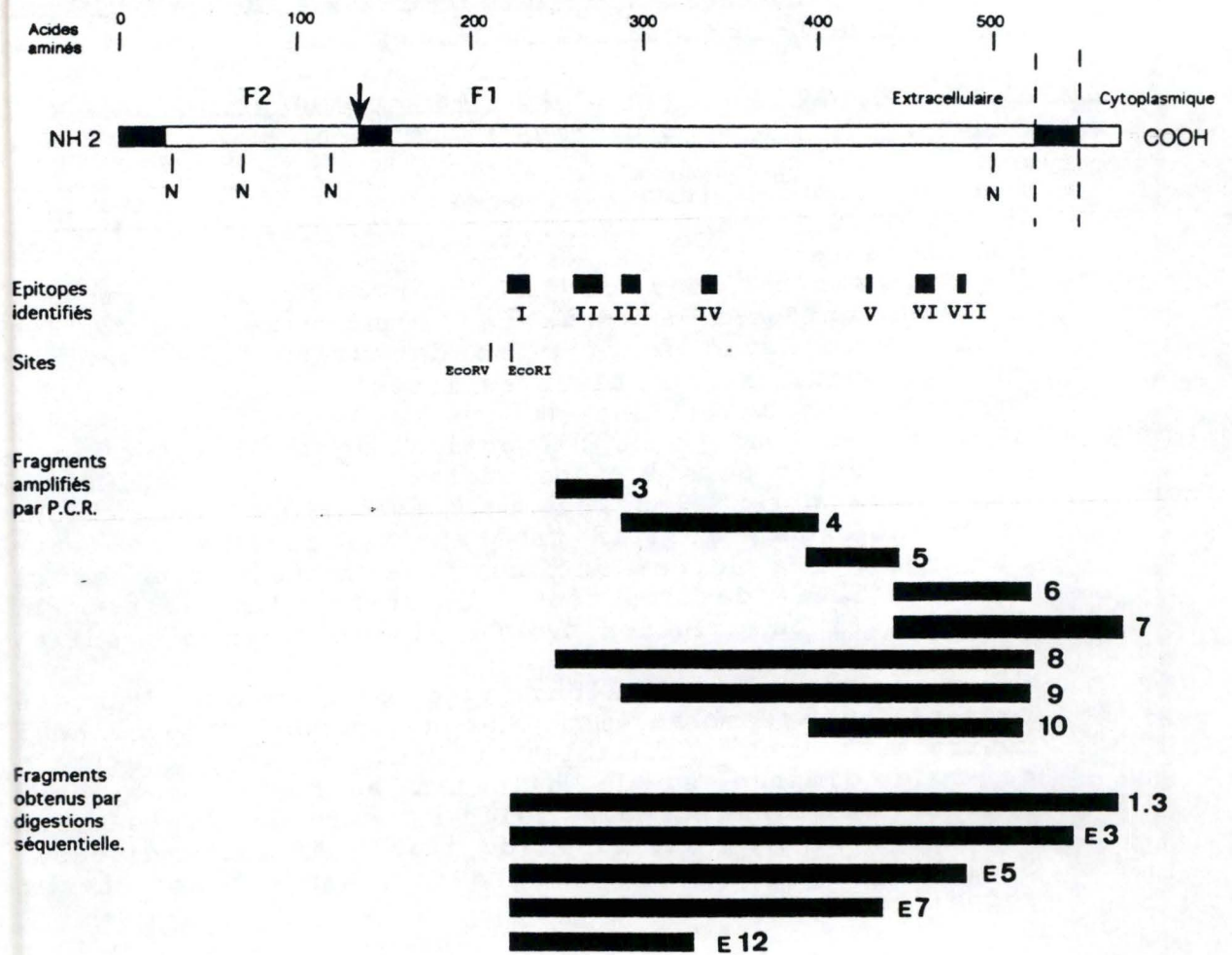


Figure III.14 : Description des fragments de gènes amplifiés par la technique PCR et des fragments obtenus après digestion séquentielle, ainsi que la position des polypeptides qu'ils généreront par rapport à la séquence de la protéine F. Les zones noircies correspondent à des régions hydrophobes (respectivement le peptide signal, le peptide fusogène et le domaine intramembranaire). La flèche indique le site de clivage entre les sous-unités F1 et F2. La lettre N montre les zones de N-glycosylation potentielles. Enfin, nous avons ajouté les régions déjà décrites comme épitopes inhibiteurs de fusion et/ou neutralisants

4. PREPARATION DE FRAGMENTS DE SEQUENCE DU GENE F
OBTENUS PAR PCR ET PAR DIGESTION SEQUENTIELLE

Sachant que l'anticorps monoclonal AK13A2 reconnaît le fragment F1 en conditions dénaturantes et dans l'espoir d'en obtenir d'autres, la mise au point du test des anticorps réactionnels sur lysats bactériens et le clonage des fragments de la séquence du gène F ont été réalisés en parallèle.

4.1. But et stratégie de clonage

4.1.1. Fragments obtenus par PCR (figure III.14)

Cette préparation de fragments de la séquence du gène F est réalisée grâce à la technique PCR (Polymerase Chain Reaction, voir matériel et méthodes). Huit régions de la séquence du gène F ont été amplifiées (figure III.14) et certaines d'entre elles présentent un recouvrement de séquence.

Celles-ci ont été choisies sur base de résultats apportés par un Peptide Scanning (PEPscan) et d'épitopes déjà décrits sur la protéine F du HRSV.

La technique de peptide scanning a permis d'identifier les épitopes B reconnus par des anticorps polyclonaux de bovins infectés et par différents anticorps monoclonaux anti-F.

Ces fragments pourront être clonés dans le vecteur d'expression pMAL - cRI et seront exprimés (après transformation et induction à l'IPTG) sous forme de protéine de fusion. Cette protéine de fusion sera sous la forme MBP - Protéine tronquée F.

...

n°	Séquence et orientation	Position
1	5'-GACGGATCCATTGCAAAGTATGACTGT-3'	1164
2	3'-CTGTAGATTTTGAAGTACGTTTCATCG-5'	1164
3	5'-GAGTGGATCCATTATGTCAGTGCT-3'	860
4	3'-CGTTTGTCTCAATTAGGTAAGACGTCAGG-5'	860
5	5'-TATGGATCCATGAGAGGAGTTGATACT-3'	1347
6	3'-GTTTGTCTCCTCAAAGTATGACGTCGAC-5'	1347
7	5'-TACCGGATCCCTCAGTACATACATG-3'	740
8	3'-GTGGGGAGTCATGTATCGACGTCTGG-5'	740
9	3'-TACTGCAGATCTGGTGGATTATCCTACA-5'	1551
10	3'-AACTGCAGATCTTGGCGGATAG-5'	1801

Tableau III.1 : Liste des oligonucléotides synthétisés en vue de l'amplification de fragments du gène de la protéine F.

Ces différents clonages permettront la purification de ces protéines tronquées par chromatographie d'affinité sur colonne d'Amylose et clivage de la protéine de fusion par le facteur de coagulation Xa libérant la protéine tronquée de la Maltose Binding Protein.

4.1.2. Fragments obtenus par digestion séquentielle (figure III.14)

La gène de la protéine F a été cloné au niveau du vecteur pBluescript (point 2). Ce travail avait été réalisé dans le but de séquencer le gène F via des délétions au niveau du gène F par l'activité Exonucléase III. Les fragments de digestion séquentielle obtenus, clonés dans le pBluescript sont au nombre de 5 y compris le morceau d'environ 1300 pb du gène F. En ce qui concerne quatre de ceux-ci, ils sont le résultat de la digestion séquentielle du morceau de 1300 pb du gène F. Le fragment total de 1300 pb (libéré par restriction EcoRI du gène F) ayant été cloné séparément dans le vecteur pBluescript.

De nouveau, les fragments 2 --> 5 (fragments du morceau de 1300 pb du gène F) pourront aussi être clonés au niveau du vecteur pMAL - cRI. Nous exprimerons aussi des protéines tronquées sous forme de protéine de fusion MBP - Protéine tronquée. De même que précédemment, nous pourrions purifier celles-ci par colonne d'amylose suivie du clivage par le facteur Xa. Le morceau de 1300 pb du gène F sera cloné de la même manière.

4.1.3. Utilité des protéines tronquées obtenues

Ces fragments protéiques permettront de préciser la localisation des sites antigéniques au niveau de la protéine F .

4.2. Préparation des fragments PCR

Nous avons défini les différents oligonucléotides utilisés en PCR (tableau III.1) sur base de la séquence du gène de la protéine F du BRSV (WALRAVENS et AL, 1990).

Par l'utilisation combinée de ces oligonucléotides (figure 20), 8 fragments de DNA ont été amplifiés par la technique PCR. La figure III.14 montre l'ensemble des fragments amplifiés et le positionnement sur la séquence de la protéine F.

...

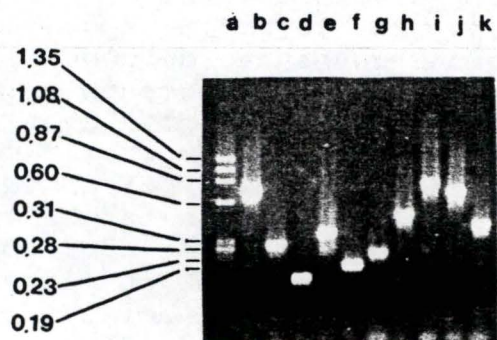


Figure III.15 : Electrophorèse sur gel d'agarose résultant de l'amplification de fragments du gène de la protéine de fusion du BRSV. La taille des marqueurs dans la piste a est exprimée en kilobases.

Des mutations ont été introduites au sein des oligonucléotides afin de générer des sites d'initiation et d'arrêt de transcription afin de cloner ces différents fragments sous forme de protéine de fusion ou dans différents vecteurs d'expression bactériens et viraux. Ces mutations permettent aussi d'obtenir des sites de restriction (Bam HI et Pst I) compatible avec les sites présents dans les sites multiples de clonage des vecteurs d'expression utilisés.

Ces modifications ont aussi été réalisées dans l'optique de garder une longueur et une température de fusion (Tm) raisonnable à l'oligonucléotide. Cette température de fusion a été estimée par la formule d'ITAKURA et AL (1984).

Oligonucléotide n°	Température de fusion (Tm)
1	62°C
	56°C
3	56°C
4	52°C
5	54°C
6	66°C
7	56°C
8	55°C
9	65°C
10	55°C

La figure III.14 montre également la localisation d'épitopes B déjà décrits pour le HRSV dans littérature. Le résultat de l'amplification a été analysé par migration sur gel d'agarose 1,6 % afin de vérifier la taille des fragments amplifiés.

La figure III.15 nous confirme bien la présence de fragments amplifiés de taille attendue. Les pistes D, E, F, G, H, I, J et K correspondent respectivement aux fragments de même numérotation 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10.

- Restriction en vue du clonage

10 µg des fragments PCR 3 à 10 ont été digérés successivement par l'enzyme Pst I et puis par l'enzyme Bam HI.

4.3. Préparation des différents fragments obtenus par digestion séquentielle

Chaque fragment, y compris le morceau de 1300 pb, sont déjà clonés au niveau du vecteur pBluescript KS+.

...

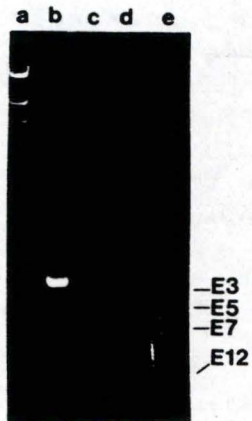


Figure III.16 : Electrophorèse sur gel d'agarose des fragments de 1,3 kb extraits des plasmides recombinants pBluescript E3-E5-E7-E12

Piste a : marqueur λ restreint par *Hind*III

Piste b : E3

Piste c : E5

Piste d : E7

Piste e : E12 (non visible < 10 ng)



Figure III. 17 : Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide recombinant pBluescript -1,3 restreint par *Eco*RI

Piste a : pBluescript -1,3 (*Eco*RI)

Piste b : marqueur λ restreint par *Hind*III

Ces fragments sont dénommés E3, E5, E7, E12.

Le fragment de 1300 pb a été resorti du plasmide recombinant pKS+ - F par la restriction EcoRI (point 1.1.B.). On a procédé au processus de digestion séquentielle jusqu'à obtenir les différents fragments (réalisé par K.WALRAVENS dans le cadre de sa thèse de doctorat). Après filling des bouts protrudants, les vecteurs recombinants digérés ont été reliés. Afin de ressortir ces différents fragments (1,3 - E3 - E5 - E7 - E12), il suffit de restreindre soit par EcoRI (uniquement pour le fragment 1,3 total) soit par les enzymes PvuII et EcoRI (pour E3 - E5 - E7 - E12). Dans le cas des fragments E3 --> E12, la restriction par EcoRI permettra une mise en phase des cadres de lecture respectifs de ces derniers et du gène de la MBP du plasmide pMAL-cRI.

L'insert récupéré aura une extrémité blunt (PvuII) et protrudante (EcoRI) ou deux extrémités protrudantes (EcoRI).

Résultat des restrictions et de la récupération de bandes correspondants aux différents fragments

Un échantillon (1/10) des fragments d'ADN récupérés par le kit GENE CLEANa été mis sur gel d'agarose (1 %). Nous disposons encore :

- de plus de 5 µg du fragment E3
- de plus de 2 µg du fragment E5
- de plus de 2 µg du fragment E7
- d'au moins 500 ng du fragment E12

(figure III.14)

- de plus de 2 µg du fragment de 1.3 kb (figure III 17) montrant pSK+ - 1,3 digéré EcoRI, échantillon de 1/10 du mélange de restriction).

...

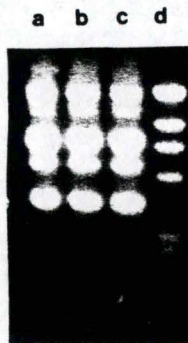


Figure III.18 : Electrophorèse sur gel d'agarose de l'extraction d'ADN plasmidique (méthode QIAGEN)

Pistes a,b,c : pMAL-cRI

Piste d : marqueur λ restreint par *Hind*III

5. PREPARATION DU VECTEUR pMAL - cRI

5.1. Préparation du vecteur pour le clonage des fragments et du morceau de 1300 pb

5.1.1. Préparation du plasmide pMAL - cRI

Nous avons extrait le plasmide de la souche HB101 par méthode MIDIPREP QIAGEN (figure III.18). L'ADN de Midiprep a été resuspendu dans de l'eau distillée stérile et nous en avons prélevé un échantillon (1/10) pour une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 %. Nous disposons de 30 ug d'ADN plasmidique.

a. Restriction par Pst I

20 µg de plasmide pMAL-cRI ont été restreints par 20 Unités d'enzyme PstI.

L'ADN plasmidique est ensuite purifié par une extraction au phénol suivie d'une précipitation à l'éthanol. Un échantillon (1/10) est soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %). L'observation sous UV montre que le plasmide a été effectivement digéré et est donc linéarisé.

...



Figure III.19 : Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide pMAL-cRI préparé *Eco*RI et *Pst* I-Klenow-*Eco*RI après récupération des bandes (par la méthode de GENE CLEAN) :
piste a : pMAL-cRI *Eco*RI
piste b : pMAL-cRI *Pst* I-Klenow-*Eco*RI
piste c : .marqueur λ restreint par *Hind*III

b. Filling

Le plasmide pMAL - cRI, restreint, a été soumis à l'action du fragment Klenow de l'ADN polymérase.

Après une heure d'incubation à 14°C, l'enzyme a été dénaturée par extraction au phénol, puis l'ADN a été précipité à l'éthanol et resuspendu dans 30 µl d'eau distillée stérile.

c. Restriction par EcoRI

Les 30 µl de solution d'ADN plasmidique ont été soumis à l'action de l'enzyme EcoRI. L'électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %) d'un échantillon des mélanges de restriction suivie de l'observation sous UV indique que nous disposons encore d'environ 5 µg de plasmide préparé .

5.1.2. Préparation par EcoRI

5 µg de plasmide pMAL-cRI a été restreint par EcoRI afin de cloner le fragment entier de 1,3kb. L'observation sous UV montre que le plasmide a bien été digéré et linéarisé.

5.1.3. Récupération des bandes

Cette récupération a été réalisée comme précédemment par la méthode GENE CLEAN (Bio 101). L'observation sous UV d'un échantillon (1/15) montre que nous disposons encore de plus de 2 µg de matériel (figure III.19).

5.1.4. En résumé

Nous avons donc préparé le plasmide pMAL-cRI de deux façons différentes :

- Pst I - Klenow - BamHI (1)
- EcoRI (2)

(1) sera accepteur des fragments E3, E5, E7, E12

(2) sera accepteur du morceau de 1300 pb

...

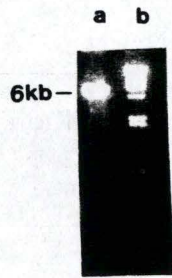


Figure III.20 : Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide pMAL-cRI préparé par restriction *Bam* HI et *Pst* I après récupération de la bande par la méthode de GENE CLEAN.

5.2. Préparation du vecteur pour le clonage des fragments obtenus par PCR

5.2.1. Préparation du plasmide pMAL - cRI

a. Restriction par Bam HI

10 µg de plasmide pMAL-cRI ont été restreints par 10 unités d'enzyme Bam HI .

L'ADN plasmidique est ensuite purifié par une extraction au phénol suivie d'une précipitation à l'éthanol.

Un échantillon (1/10) a été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %).

L'observation sous UV montre que le plasmide a été digéré et linéarisé.

b. Restriction par Pst I

La préparation d'ADN plasmidique est soumise à l'action de dix unités d'enzyme Pst I.

c. Récupération de bandes

Comme précédemment, la récupération a été réalisée par la méthode GENE CLEAN (Bio 101).

L'observation d'un échantillon (1/10) montre que nous disposons encore d'environ 5 µg d'ADN plasmidique (figure III.20).

Nous ne sommes pas parvenus à insérer nos fragments dans le vecteur de clonage . Ce point sera discuté plus loin (voir Problèmes de clonage).

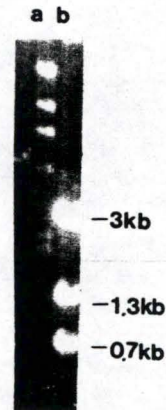


Figure III.21 : Electrophorèse sur gel d'agarose du plasmide recombinant pBluescript-F restreint par *Eco*RI
 piste a : marqueur λ restreint par *Hind*III
 piste b : pBluescript-F restreint par *Eco*RI



Figure III.22 : Electrophorèse sur gel d'agarose des morceaux de 700pb et de 1300 pb du gène F après récupération par la méthode du GENE CLEAN
 piste a : morceau de 700 pb
 piste b : morceau de 1300 pb
 piste c : marqueur λ restreint par *Hind*III

6. MISE AU POINT D'UNE SONDE F MARQUEE A LA DIGOXYGENINE

6.1. But de la mise au point de la sonde

Nous allons cloner une dizaine de fragments de la séquence du gène F. Cette sonde permettra, après transformation, un screening rapide des colonies transformantes. Un autre avantage de cette sonde est qu'elle n'est pas marquée de façon radioactive.

6.2. Mise au point de la sonde F

Nous avons utilisé le plasmide pKS+ - F (point 1.1.1.) pour commencer la mise au point.

Nous avons ressorti le gène F du plasmide recombinant par restriction EcoRI. De part cette restriction, le gène F a été scindé en deux morceaux de 700 et 1300 pb.

6.2.1. Restriction par EcoRI

10 µg de plasmide recombinant ont été restreints par 10 Unités d'enzyme EcoRI. Le mélange de restriction a été ensuite déposé sur gel d'agarose 0,8 % et a été soumis à une électrophorèse suffisamment longue pour permettre une bonne séparation des bandes d'ADN (figure III.21).

6.2.2. Récupération des bandes de 700 et 1300 pb

Cette récupération a été réalisée par GENE CLEAN (Bio 101). Le rendement de la récupération a été estimé en déposant 1/10 du matériel récupéré sur un gel d'agarose 0.8% (figure III.22).

6.2.3. Marquage de l'ADN à la DIGOXYGENINE

Voir matériel et méthodes (point 8).

...

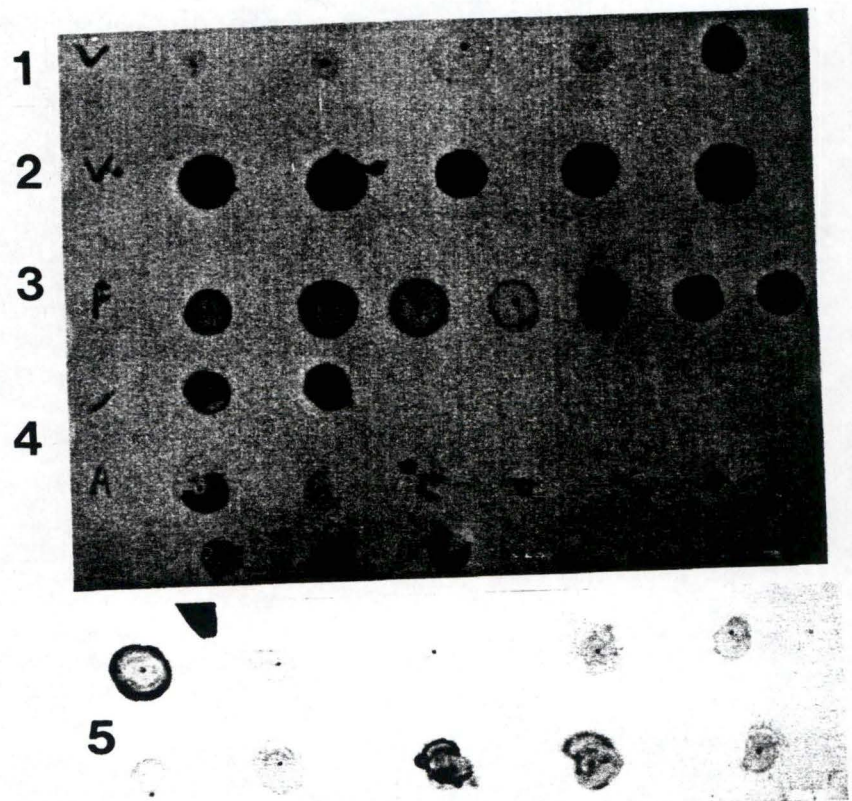


Figure III.23 : Tests de spécificité de la sonde F marquée à la DIGOXYGENINE
 piste 1 (V) : test sur différents vecteurs et le vecteur pBluescript
 piste 2 (V) : test sur les vecteurs recombinants
 piste 3 (F) : test sur les fragments du gène F obtenus par digestion séquentielle
 pistes 4 (A) et 5 : tests sur les différents fragments obtenus par PCR à partir de la séquence du gène F

6.3. Vérification de la spécificité de la sonde

A. Dot Blot de différents échantillons

Nous avons déposé sur bande de nitrocellulose (figure III. 23 et 24) :

- . 2 ul de plusieurs vecteurs (Pex II - Pex I - PMAL - CRI - PMJ) et 2 ul de vecteur recombinant pSK+ - F.
- . 2 ul de vecteurs recombinants pKS+ contenant les morceaux de 700 et 1300 pb et leurs fragments obtenus par digestion séquentielle :
 - . pKS + - 0,7 A
 - . pKS + - 0,7 A1
 - . pKS + - 0,7 A3
 - . pKS+ - F
- . 2 ul de chaque fragment (provenant d'une récupération par GENE CLEAN
 - . 0,7 A
 - . 0,7 A1
 - . 0,7 A3
 - . 1,3 E3
 - . 1,3 E5
 - . 1,3 E7
 - . 1,3 E12
 - . 1,3 total
- . 1 ul de chaque fragment obtenu par PCR.

3 --> 10

B. Résultats

Ce test nous montre que la sonde est bien spécifique du gène F. Il n'y a pas de signal positif au niveau des vecteurs de clonage. Par contre, au niveau du dépôt du vecteur recombinant pKS+ - F, nous observons un signal intense (voir figure III.23). Pour les autres échantillons (vecteurs recombinants et fragments) , nous obtenons un signal positif mais plus faible.

Cette intensité du signal est probablement due au prélèvement accidentel d'huile minérale recouvrant la solution PCR. De plus, la quantité prélevée (1µl) est faible.

...

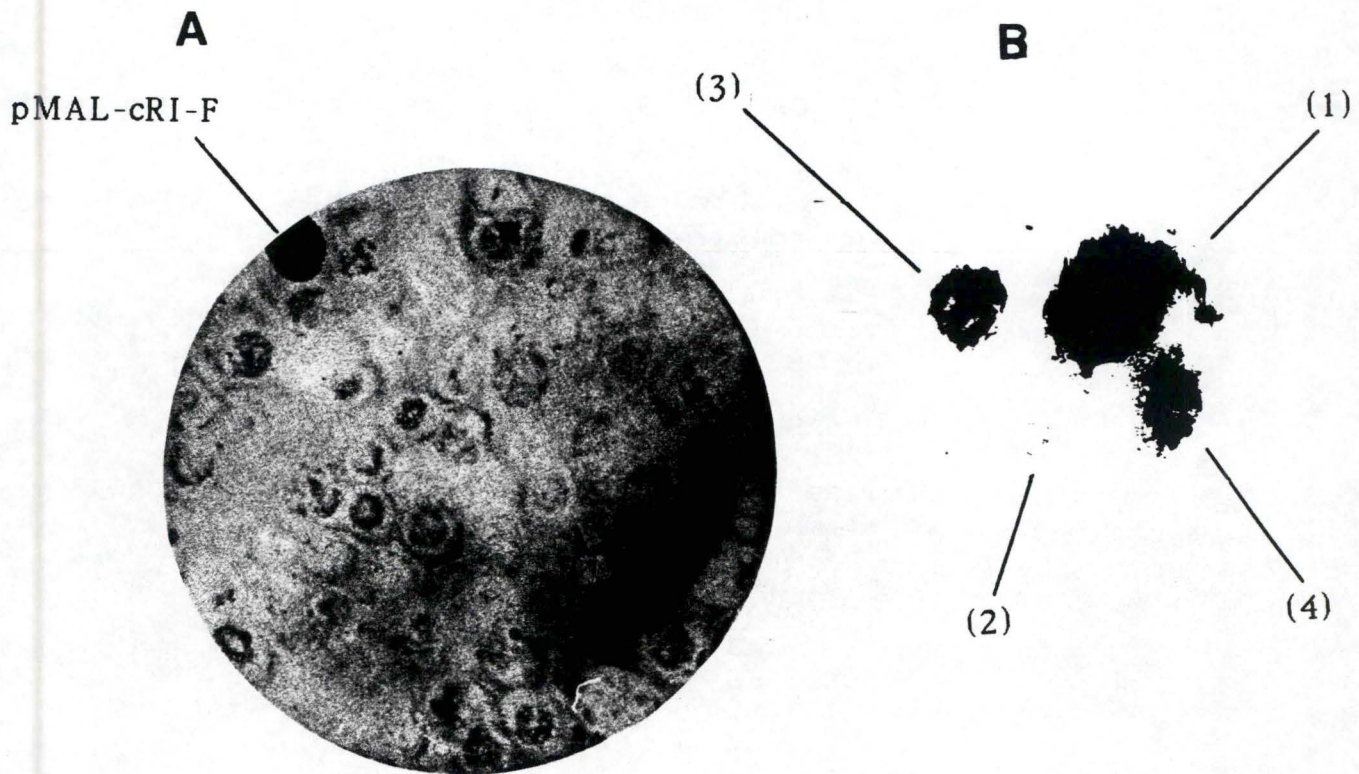


Figure III.24 : Résultat de l'hybridation sur boîte au moyen de la sonde F marquée à la DIGOXYGENINE

a : test sur boîte

b : test sur témoins positifs et négatifs constitués par des bactéries recombinantes :

pMAL-cRI-F (1)

pMAL-cRI (2)

pBluescript-F (ADN pur) (3)

pBluescript (4)

7. PROBLEMES DE CLONAGE

Nous avons rencontré divers problèmes de clonage avec les fragments obtenus par digestion séquentielle et par PCR.

7.1. Clonage des fragments obtenus par digestion séquentielle

Comme déjà énoncé au point 3, nous avons effectué une récupération des bandes relatives aux différents fragments par la méthode GENE CLEAN (BIO 101). Nous sommes donc certains de la pureté et de la digestion de ceux-ci.

Un excès des fragments E3, E5, E7, E12 et le morceau de 1300 pb a été mis en présence de 100 ng de plasmide accepteur.

- Plasmide pMAL - cRI préparé PstI KLENDW EcoRI + E3, E5, E7, E12

- Plasmide pMAL - cRI préparé EcoRI + 1,3 Total

Le mélange de ligation a été incubé une nuit à 16°C.

La transformation a été réalisée par électroporation sur des bactéries XLI Blue compétentes. L'étalement s'est fait sur milieu sélectif NZYM + ampicilline. Les boîtes de pétri ont été placées une nuit à 37°C. Nous avons ensuite, procédé à une hybridation sur boîte grâce à la sonde F marquée à la DIGOXYGENINE.

7.1.1. Problèmes rencontrés

7.1.1.A. Mauvaise préparation du plasmide accepteur

Les transformants que nous avons obtenus sont uniquement des bactéries transformées par le vecteur relié sur lui-même sans insert. L'hybridation sur colonies avec la sonde F digoxygénine n'entraîne l'apparition d'aucun signal positif (figure III.24)

...

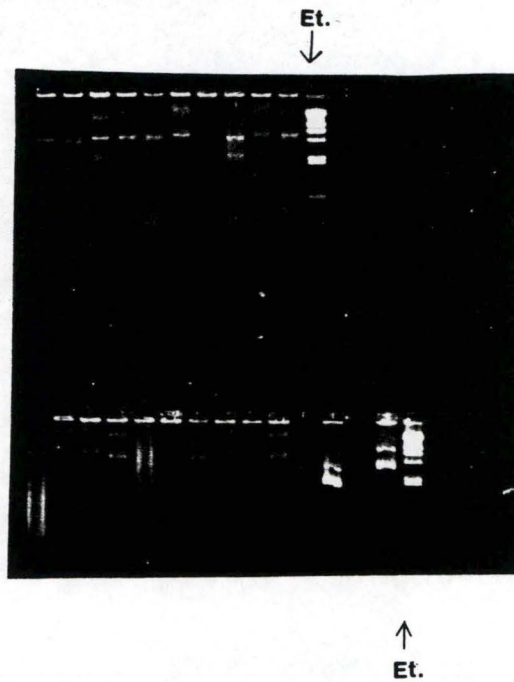


Figure III.25 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN de miniprep de bactéries recombinantes pMAL-cRI-fragments de 1300pb après restriction par *Hind* III.



Figure III.26 : Electrophorèse sur gel d'agarose d'ADN de miniprep de bactéries recombinantes pMAL-cRI-fragments de 1300pb après restriction par *Eco*RI .

7.1.1.B. Clonage

Lors d'un second essai de clonage (après reparation du vecteur), nous avons obtenu quelques colonies transformantes.

En effet, l'hybridation sur boîte donnait des signaux positifs). Nous avons donc procédé à une extraction rapide d'ADN (miniprep) des colonies positives. Un échantillon de chaque préparation a été restreint par l'enzyme Hind III dans un premier temps. Le reste de la préparation a été soumis à l'action de l'enzyme EcoRI.

Pour chaque restriction, nous obtenons un pattern de 3 ou 4 bandes selon l'échantillon. Il semble que la restriction n'ait pas marché : les sites EcoRI ou Hind III ont peut-être disparus, ceci résultant d'un remaniement de l'ADN et rendant inefficace l'action des enzymes de restriction (figure III.25 et 26). Enfin, nous remarquons qu'il n'y a pas eu religation du vecteur sur lui-même.

7.2. Clonage des fragments obtenus par PCR

Nous avons essayé de cloner les fragments 3 à 10 sont clonés dans le vecteur d'expression pMAL - cRI. La démarche expérimentale est identique à celle suivie lors du précédent clonage.

7.2.1. Problèmes rencontrés

7.2.1.A. Clonage sans purification de l'ADN

Contrairement aux fragments obtenus par digestion séquentielle, nous n'avons pas procédé à une purification des fragments par GENE CLEAN : la taille des fragments est trop petite.

Le clonage n'a donné aucun résultat : pas de transformant. Il n'y a pas religation du vecteur car le clonage est forcé (extrémités protrudantes BamHI et PstI incompatibles).

...

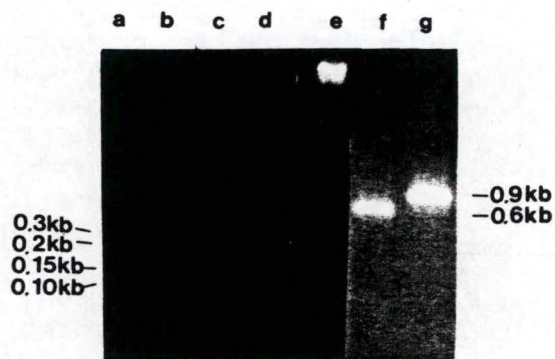


Figure III.27 : Résultat sur gel d'agarose de la purification des fragments du gène F obtenus par PCR.

piste a : fragment 3

piste b : fragment 4

piste c : fragment 5

piste d : fragment 6

piste e : marqueur λ restreint par *Hind*III

piste f : fragment 9

piste g : fragment 8

7.2.1.B. Extraction au phénol -----

La Taq Polymérase, encore présente au niveau de la solution contenant les fragments PCR et fixée au niveau du DNA, pourrait interférer avec l'action des enzymes de restriction.

Nous avons donc procédé à une extraction au phénol-chloroforme des différentes solutions, suivie des digestions BamHI et PstI.

Aucun transformant n'a été obtenu.

7.2.1.C. Clonage avec purification -----

Le mélange d'amplification contient toujours les dNTPs et les primers nécessaires à la réaction effectuée par la Taq polymérase.

Les dNTPs sont des inhibiteurs de la T4 DNA ligase : ils entrent en compétition avec l'ATP qui est nécessaire à son activité (inhibiteurs compétitifs). Les primers peuvent interférer avec l'action des enzymes de restriction.

Nous avons donc purifié les fragments PCR par colonne MAGIC PREP PCR (Voir matériel et méthodes).

L'observation sous UV d'échantillons montre que la purification a bien fonctionné (figure III.27).

Ensuite, nous avons procédé à la digestion de ces fragments suivie d'une ligation et de la transformation. après transformation, aucune colonie ne s'est développée sur le milieu sélectif.

7.2.1.D. Clonage après purification et extraction ----- au phénol -----

N'étant pas parvenu à éluer nos fragments avec les démarches précédentes nous avons combiné la technique de purification sur colonne avec l'extraction au phénol-chloroforme.

...

1. Purification sur colonne
2. Extraction au phénol-chloroforme
3. Restrictions
4. Ligation et transformation

Encore une fois, aucun transformant.

7.2.2. Questions et solutions envisagées

Le problème pourrait se poser au niveau du vecteur car clonage difficile. Enfin, la purification des fragments doit être réalisée avant et après les restrictions enzymatiques. Ceci afin de purifier les fragments de la solution PCR et d'éliminer les quelques nucléotides libérés au cours des différentes restrictions. En effet, ceux-ci peuvent se lier au plasmide accepteur ou au fragment PCR lui-même et empêcher ainsi l'insertion de l'insert.

DISCUSSION

Si les mécanismes cellulaires revêtent une importance particulière dans la défense contre le RSV lors d'une primo-infection, ceux-ci semblent également impliqués dans le développement de lésions tissulaires graves (GRAHAM et al, 91). L'immunité humorale, quant à elle, paraît prépondérante lors d'une réinfection. Seules les protéines F et G peuvent induire la production d'anticorps neutralisants. Néanmoins, ces protéines sont capables d'éliciter à la fois des anticorps neutralisants et non-neutralisants impliqués selon certains auteurs dans les problèmes immunopathologiques. Dans ce contexte, un vaccin favorisant l'émergence d'anticorps neutralisants induirait une protection efficace sans entraîner l'apparition de lésions pathologiques.

Notre travail s'est focalisé sur la protéine de fusion dans le but de localiser les épitopes B portés par cette protéine. Nous avons amplifié certaines séquences du gène F susceptible de recouvrir un ou plusieurs épitopes B. Celles-ci ont été définies sur base d'épitopes déjà localisés (figure III.14) et sur base de résultats de peptide scanning (PEPSCAN) à l'aide de polyséras de bovins, infectés naturellement, (réalisé par JP. MATHEISE dans notre laboratoire). Le clonage au niveau du vecteur pMAL-cRI permettra l'expression dans E.coli de différents fragments obtenus par PCR et par digestion séquentielle (système Exonuclease III). Ces fragments, produits sous la forme de protéine de fusion, pourront être testés dans un premier temps, par des anticorps monoclonaux. La purification des protéines tronquées sera possible et des études plus élaborées seront envisagées (immunisation, TTL, ...).

Dans un premier temps, nous avons cloné le gène de la protéine F dans le vecteur pMAL-cRI dans le but de vérifier si une expression du gène F donnait des résultats satisfaisants. Ensuite, la mise au point de test de détection à d'anticorps monoclonaux ainsi que le clonage de fragments du gène de la protéine F dans le vecteur pMAL-cRI furent entrepris simultanément.

Un test de révélation immunoenzymatique par l'anticorps monoclonal AK13A2 met en évidence une expression optimale de la protéine F sous forme de protéine de fusion MBP-F (Maltose Binding Protein-F) 3 heures après induction à l'IPTG (T3). Ce résultat démontre que l'expression en vecteur procaryote du gène de la protéine F est réalisable. En effet, plusieurs expériences récentes ont montré que l'expression de la protéine F sous forme native induisait la mort des cellules bactériennes. Cette toxicité peut être évitée si on élimine la zone codant pour le peptide signal de cette protéine (MARTIN-GALLARDO, 1991). D'après notre résultat, il semblerait que l'expression du gène F sous forme de protéine de fusion avec la protéine de liaison au maltose permette d'éviter aussi la toxicité due à la protéine F. Il est probable que son accumulation dans la paroi perturbe E.coli

...

provoquant sa lyse ou un arrêt de sa croissance. Dès lors, l'excision du peptide signal de la protéine F ou le clonage de celle-ci en fusion avec un gène permettant l'expression et l'accumulation de la protéine F dans le cytoplasme de la bactérie permettrait d'éviter la lyse ou l'arrêt de sa croissance.

Néanmoins, l'analyse du produit d'expression montre que la protéine de fusion est clivée en plusieurs endroits : la MBP (Maltose Binding Protein) est séparée de la protéine F qui est elle-même scindée en ses deux sous-unités F1 entière et F2 qui n'est pas identifiée au niveau de nos gels SDS-PAGE. Ce clivage est dû à des protéases d'E.coli. La purification de la protéine F sur colonne d'amylose n'est donc pas possible.

Cependant, nous nous sommes concentrés sur l'expression de fragments recouvrant des séquences de la sous-unité F1 du gène de la protéine F. D'après l'analyse de nos gels, celle-ci ne semble pas être clivée lorsqu'elle est exprimée dans notre système. De plus, l'expression du gène F1 ayant été déjà réussie dans E.coli (MARTIN-GALLARDO, 1991), nous imaginons possible l'expression de fragments du gène F1 en fusion avec la MBP sans qu'aucun clivage ne nous prive de la possibilité de purifier ces polypeptides.

L'expression des fragments en protéines de fusion modifiant sans doute la configuration de la protéine, nous avons caractérisé huit anticorps monoclonaux fonctionnant en condition dénaturantes (SDS) c'est à dire qui reconnaissent des épitopes continus de la protéine de fusion. Nous avons ensuite testé ces anticorps sur le produit d'expression du clone pMAL - F afin de mettre au point le test sur lysats SDS de bactéries recombinantes blottés sur nitrocellulose. Seul l'anticorps AK13A2 donne des résultats satisfaisants. La plupart des autres anticorps donnent un bruit de fond élevé à faible dilution et une réaction quasi nulle à forte dilution. Ceci est dû au fait que le liquide d'ascite avec lequel nous travaillons contient des anticorps anti-Coli. De plus, certains de ces anticorps monoclonaux ont une faible avidité pour l'antigène comparée à celle de l'anticorps AK13A2. Plusieurs solutions permettront sans doute dans un futur proche de contourner ces problèmes :

- Travailler à l'aide de surnageants denses plutôt que des liquides d'ascites comme source d'anticorps.
- Epuiser les anticorps sur des antigènes d'E. coli.
- Purifier partiellement ou totalement les fragments de protéines exprimées...

Enfin, le clonage des fragments de la protéine F a été entrepris. Ces fragments obtenus par amplification PCR ou digestion séquentielle du gène de la protéine de fusion ont été préparés en vue d'être clonés en vecteur pMAL-cRI. Ces clonages difficiles n'ont malheureusement pas été fructueux. Une fois ces problèmes résolus, l'expression des fragments

...

du gène F permettra une première cartographie des épitopes B de cette protéine.

PERSPECTIVES.

Les résultats générés par ce travail ont permis de poser les premiers jalons de l'étude plus générale de la cartographie des épitopes B portés par la protéine de fusion du Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV).

Dans un premier temps, il conviendra de pallier les problèmes de clonage rencontrés au cours de ce travail. Enfin, les tests de détection des fragments par les anticorps monoclonaux devront être optimisés.

Sur base de ces mises au point, une cartographie des épitopes B de la protéine de fusion du BRSV pourra être entreprise. La réactivité des anticorps sur les fragments de la protéine F décrit ci-dessus consistera en une première analyse grossière. Ensuite, une cartographie plus précise pourra être entreprise. D'une part, le clonage de fragments de taille plus réduite, mais également de zones de recouvrement étroites de divers fragments sera effectué. D'autre part, la synthèse de courts peptides sera envisagée afin de localiser le plus précisément possible les épitopes B portés par la protéine de fusion.

Enfin, lorsque des épitopes reconnus par des anticorps monoclonaux seront clairement identifiés, l'immunisation d'animaux de laboratoire à l'aide des fragments protéiques ou des peptides de synthèse recouvrant les zones identifiées sera envisagée. Cette démarche permettra de déterminer si ces peptides sont capables d'induire une réponse hautement neutralisante. Rappelons que, contrairement aux épitopes non neutralisants, les épitopes neutralisants semblent impliqués dans la protection vis-à-vis du BRSV. Des infections d'épreuve seront enfin réalisées afin de vérifier si la réponse obtenue après immunisation s'avéra protectrice et si elle ne s'accompagne pas d'aggravations immunopathologiques.

BIBLIOGRAPHIE ET REFERENCES

- Aherne W., Bind T., Court S.D.M., Gardner P.S., Mc Quillin J., 1970. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J. Clin. Pathol.*, 23 : 7 - 18.
- Anderson L.J., Hendry R.M., Pierik L.T., Tson C., and McIntosh K., 1991. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.*, 163 : 687 - 692.
- Anderson J.J., Norden J., Saunders D., Toms G.L., Scott R., 1990. *J.G. Virol.*, 71 : 1561 - 1570. Austen.
- Anderson L.J., Bingham P. and Heirholzer J.C., 1988. Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 62 : 4235 - 4238.
- Annaba G.A. and Anderson L.J., 1991. Antibody enhancement of respiratory syncytial virus stimulation of leukotriene production by a macrophage - like cell line. *J. Virol.*, 65 : 5052 - 5060.
- Arbiza J., Taylor G., Lopez J.A., Furze J., Wylds., Wite P., Stott E.J., Wertz G.W., Sullender W., Trudel M. and Melexo J.A. (1992). Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 73 : 2225 - 2234.
- Arumugham R.G., Hildreth S.W., Paradiso P.R., 1989a. Interprotein disulphide bonding between F and G glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.*, 105 : 65 - 79.
- Baker J.C., Wilson E.G., Mc Kay G.L., Stanck R.J., Underwood W.J., Velicer L.F., Mufson M.A., 1992. Identification of subgroups of bovine respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.*, 35 : 1120 - 1126.
- Bangham C.R.M., 1986. Passively acquired antibodies to respiratory syncytial virus impair the secondary cytotoxic T - cell response in the neonatal mouse. *Immunology*, 59 : 37 - 41.
- Belknap E.B., Baker J.C., Patterson J.S., Walker K.D., Haines D.M. and Clark E.G., 1991. The role of passive immunity in bovine respiratory syncytial virus-infected calves. *J. Inf. Dis.*, 163 : 470 - 476.

Bourgeois C., Corvaisier C., Bour J.B., Kohli E. and Pothier P. (1991). Use of synthetic peptides to locate neutralizing antigenic domains on the fusion protein of respiratory syncytial virus. *J.G. Virol.*, 72 : 1051 - 1058.

Brambell F.W.R., 1970. The transmission of passive immunity from mother to young. North Holland Publishing Co., Amsterdam.

Cannon M.J., Stott E.J., Taylor G., and Askonas B.A., 1987. Clearance of persistent respiratory syncytial virus infections in immunodeficient mice following transfer of primet T cells. *Immunology*, 62 : 133 - 138.

Chanock R.M., Kapikian A.Z., Mills J., Kim H.W. and Parrot R.H., 1970. Influences of immunological factors in respiratory syncytial virus disease of the lower respiratory tract. *Arch. Environ. Health*, 21 : 347.

Cherric A.H., Anderson K., Wertz G.W. and Openshaw P.J.M., 1992. Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22 K and 1B proteins of respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, 66 : 2102 - 2110.

Chonmaitree T., Cett-Brown M.A., Grant J.A., 1991. *J. inf. Dis.*, 592 - 594.

Collins P.L., Mottet G., 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 72 : 3095 - 3101.

Collins P.L., Huang Y.T., and Wertz G.W., 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, 81 : 7683 - 7687.

Cote P.J.Jr., Fernie B.F., Ford E.C., Shih J.W.K., Gerin J.L., 1981. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus : detection of virus neutralization and other antigen antibody systems using infected human and murine cells. *J. Virol. Methodes*, 3 : 137 - 147.

Fernald G.W., Almond J.R., Henderson F.W., 1983. Cellular and humoral immunity in recurrent respiratory syncytial virus infections. *Pediatr. Res.*, 17 : 753 - 758.

Fernie B.F., Dapolito G., Cote P.J., Jr and Gerin J.L., 1985. Kinetics of synthesis of respiratory syncytial virus glycoproteins. *J. Gen. Virol.*, 66 : 1983 - 1990.

Garcia-Barrens B., Palomo C., Penas C., Delgado T., Perez-Brena P., and Melero J.A., 1989. Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *J. Virol.*, 63 : 925 - 932.

Gimenez H.B., Hardman M., Keir H.M., and P. Cash, 1986. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. *J. Gen. Virol.*, 67 : 863 - 870.

Groothuis J.R., Levin M.J., Rodriguez W., Hall C.B., Long C.E., Kim H.W., Lauer B.A., Hemming V.G., the RSV study group, 1991. Antimicrobial agents and chemotherapy, 35 : 1469 - 1473.

Cruber C. and Levine S., 1985. Respiratory syncytial virus polypeptides. V. The kinetics of glycoprotein synthesis. *J. Gen. Virol.*, 66 : 1241 - 1247.

Hall C.B., Walsh E.E., Long C.E. and Schnabel K.C., 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 64 : 825 - 832.

Hames and Rickwood. Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. Practical Approach Series, IRL Press (1981).

Hendry R.M., Talis A.L., Godfrey E., Anderson L.J., Fernie B.F., and Mc Intosh K., 1986. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J. Infect. Dis.*, 153 : 291 - 297.

Johnson P.R. and Collins P.L., 1990. Sequence comparison of the phosphoprotein mRNAs of antigenic subgroups A and B of human respiratory syncytial virus identifies a highly divergent domain in the predicted protein. *J. Gen. Virol.*, 71 : 481 - 485.

Johnson P.R. and Collins P.L., 1988. The fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus of subgroups A and B : sequence conservation provides a structural basis for antigenic relatedness. *J. Gen. Virol.*, 69 : 2623 - 2628.

Kennedy H.E., Jones B.V., Tucker E.M., Ford N.J., Clarke S.W., Furze J., Thomas L.H., Stott E.J., 1988. Production and characterization of bovine monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 69 : 3023 - 3032.

Kim H.W., Canchola J.G., Brandt C.D., Pyles G., Chanock R.M., Jensen K. and Parrot R.H., 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology*, 89 : 422 - 434.

Kimman T.G., and Westenbrink F., 1990. Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. Arch. Virol., 112 : 1 - 25.

Kimman T.G., Westenbrink F., Schreuder B.E.C., Straver P.J., 1987. Local and systemic antibody response to bovine respiratory syncytial virus infection and reinfection in calves with and without maternal antibodies. J. Clin. Microbiol., 25 : 1097 - 1106.

Kimman T.G., Zimmer G.M., Straver P.J., de Leeuw P., 1986. Diagnosis of bovine respiratory syncytial virus infections improved by virus detection in lung lavage samples. Am. J. Vet. Res., 47 : 143 - 147.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680 - 685 (1970).

Lerch R.A., Anderson K., and Wertz G.W., 1990. Nucleotide sequence analysis and expression from combinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. J. Virol., 64 : 5559 - 5569.

Lerch R.A., Stott E.J., Wertz G.W., 1989. Characterization of bovine respiratory syncytial virus proteins and mRNAs and generation of cDNAs clones to the viral mRNA S.J. Virol., 63 : 833 - 840.

Lopez J.A., Penas C., Garcia - Barrenob, Melero J.A. and Portela A. (1990). Location of a highly conserved neutralizing epitope in the F glycoprotein of human respiratory syncytial virus. J. Virol., 64 : 927 - 930.

Martin - Gallardo A., Fien K.A., Hu B.T., Farley J.F., Sei D.R., Collins P.L., Hildreth S.W. and Paradiso P.R. (1991). Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in E. Coli : mapping of a fusion inhibiting epitope. Virology 184 : 428 - 432.

Mc Intosh K. and Chanock R.M., 1990. Respiratory syncytial virus. In virology pp 1045 - 1072. Edited by B.N. Fields and D.M. Knipe. New York : Raven Press.

Morrisson T.G., 1988. Structure, function and intracellular processing of paramyxovirus membrane proteins. Virus Res., 10 : 113 - 136.

Mufson M.A., Orvell C., Rafnar B., Norrby E., 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol., 66 : 2111 - 2124.

Mullis K.B., and Faloona F.A., 1987. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. Gold spring Harbor symp. Quant. Biol., 51 : 263 - 273.

...

Murphy B.R., Graham B.J., Prince G.A., Walsh E.E., Chanock R.M., Karzon D.T., and Wright P.F., 1986. Serum and nasal wash immunoglobulin G and A antibody response of infants and children to respiratory syncytial virus F and G glycoprotein following primary infection. *J. Clin. Microbiol.*, 23 : 1009 - 1014.

Olmsted R.A., Murphy B.R., Lawrence L.A., Elango N., Moss B. and Collins P.L., 1988. Processing, surface expression, and immunogenicity of Carboxy-terminally truncated mutants of G proteins of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, 63 : 411 - 420.

Olmsted R.A., Elango N., Prince G.A., Murphy B.R., Johnson P.R., Moss B., Chanock R.M. and Collins P.L., 1986. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus : comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*, 83 : 7462 - 7466.

Owell C., Norrby E., and Mufson M.A., 1987. Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against live structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J. Gen. Virol.*, 68 : 3125 - 3135.

Paccaud M.F., Jacquier C., 1970. A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30 : 327 - 342.

Parrott R.H., Kim H.W., Arrobio J.O., Hodes D.S., Murphy B.R., Brandt C.D., Camargo E., and Chanock R.M., 1973. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. II. Infection and disease with respect to age, immunologic status, race and sex. *Am. J. Epidemiol.*, 98 : 289 - 300.

Portela A., Rodriguez J.R., Rodriguez D., Rodriguez F., Garcia-Barreno B., Melero J.A. and Esteban M., 1989. Expression of the fusion (F) protein of human respiratory syncytial virus using an attenuated strain of vaccinia virus. In *Genetics and Pathogenicity of Negative strand viruses*, pp 74 - 78. Edited by D. Kolakofsky and B.W.J. Mahy. Amsterdam : Elsevier North - Holland.

Prince G.A., Hemming V.G., Horswood R.L., Baron P.A., Murphy B.R., Chanock R.M., 1990. *J. Virol.*, 64 : 3091 - 3092.

Prince G.A., Jenson A.B., Hemming V.G., Murphy B.R., Walsh E.E., Horswood R.L., Chanock R.M., 1986. Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin - inactivated virus. *J. Virol.*, 57 : 721 - 728.

Rammohan K.W., Mc Farland H.F. and Mc Farlin D.E., 1981. Induction of subacute murine measles encephalitis by monoclonal antibody to virus haemagglutinin. *Nature (Lond.)*, 290 : 588.

Salkind A.R., Nichols J.E., and Roberts N.J., Jr, 1991. Suppressed expression of ICAM - 1 and LFA - 1 and abrogation of leukocyte collaboration after exposure of human mononuclear leukocytes to respiratory syncytial virus in vitro. *J. Clin. Invest.*, 88 : 505 - 511.

Salkind A.R., Mc Carthy D.O., Nichols J.E., Domurat F.M., Walsh E.E., and Roberts N.J., Jr., 1990. Interleukin - 1 - inhibitor activity induced by respiratory syncytial virus : abrogation of virus - specific and alternate human lymphocyte proliferative responses. *J. info Dis.*, 163 : 71 - 77.

Scharf S.J., Horn G.T., and Herlich H.A., 1986. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 233 : 1076 - 1078.

Stec D.S., Hill III M.G., Collins P.L., 1991. *Virology*, 183 : 273 - 287.

Stott E.J., Taylor G., Ball L.A., Anderson K., Joung K.K. - Y., King A.M.Q. and Wertz G.W., 1987. Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J. Virology*, 61 : 3855 - 3861.

Taylor G., Stott E.J., Furze J., Ford J. and Sopp. P. (1992). Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J.G. Virology*, 73 : 2217 - 2223.

Taylor G., Marrow S., Scott M., Young B., Tours G.L., 1989. *The Lancet*, 777 - 778.

Taylor G., Stott E.J., Bew M., Fenrie B.F., Cote P.J., Collins A.P., Hughes M., and Jebbett J., 1984. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology*, 52 : 137 - 142.

Thein S.L., and Wallace R.B., 1986. The use of synthetic oligonucleotide as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders. *Human genetic diseases : a practical approach* (ed. K.E. Denis, p 33 - 50. IRL Press, Herndon, Virginia.

Trudel M., Nadon F., Sequin C., and Binz H., 1991. Protection of balb/c mice from respiratory syncytial virus infection by immunization with a synthetic peptide derived from the G glycoprotein. *Virology*, 185 : 749 - 757.

Trudel M., Nadon F., Simard C., Belanger F., Alain R., Sequin C., Lussier G., 1989. Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. Arch. Virol., 107 : 141 - 149.

Trudel M., Nadon F., Sequin C., Simard C., Lussier G., 1989. Experimental polyvalent ISCOMs subunit vaccine induces antibodies that neutralise human and bovine respiratory syncytial virus. Vaccine, 7 : 12 - 16.

Trudel M., Nadon F., Sequin C., Dionne G., and Lacroix M., 1987. Identification of a synthetic peptide as part of a major neutralization epitope of respiratory syncytial virus. J. Gen. Virol., 68 : 2273 - 2280.

Virella G., Nunes M.A.S. and Tamagnini G., 1972. Placental transfer of human IgG subclasses. Clin. exp. Immunol., 10 : 475.

Wagner D.K., Muelenaer P., Henderson F.W., Snyder M.H., Reimer C.B., Walsh E.E., Anderson L.J., Nelson D.L. and Murphy B.R. (1989). Serum immunoglobulin G antibody subclass response to respiratory syncytial virus F and G glycoproteins after primary, second, and third infections. J. Clin. Microbiol. 27 : 589 - 592.

Walravens K., Kettmann R., Coppe P., Collard A., Burny A., 1990. J. G. Virol., 70 : 31 - 37.

Walsh E.E., Hall C.B., Briselli M., Brandriss M.W., and Schlesinger J.J., 1987. Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. J. inf. Dis., 155 : 1198 - 1204.

Walsh E.E., Cote P.J., Fernie B.F., Schlesinger J.J., Brandriss M.W., 1986. Analysis of the respiratory syncytial virus fusion protein using monoclonal and polyclonal antibodies. J. Gen Virol., 67 : 505 - 513.

Walsh E.E., Brandriss M.W., and Schlesinger J.J., 1985. Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. J. Gen. Virol., 66 : 409 - 415.

Walsh E.E., Schlesinger J.J., Brandriss M.W., 1984. Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies. Infect. Immunol., 43 : 756 - 758.

Wellemans G., 1990. Virus infection of ruminants. Ed. Dinter Z. and Morein B., 3 : 363 - 375.

Wellemans G., 1977. Laboratory diagnosis methods for bovine respiratory syncytial virus. Vet. Sci. Commun., 1 : 179 - 198.

...

Wellemans G., Bovine Respiratory Syncytial Virus. Virus infections of vertebrates. Ed. M.C. Horzinek, Virus infections of ruminants, Vol. 3 Elsevier (90).

Welliver R.C., Sun M., Hildreth S.W., Arumugham R., Ogra P.L., 1989. Respiratory syncytial virus - specific antibody responses in immunoglobulin A and E isotypes to the F and G proteins and to intact virus after natural infection. J. Clin. Microbiol., 27 : 295 - 299.

Welliver R.C., 1988. Detection, pathogenesis, and therapy of respiratory syncytial virus infections. Clin. Microbiol. Rev., 1 : 27 - 39.

Welliver R.C., Kaul T.N., Sun M., Ogra P.L., 1984. Defective regulation of immune responses in respiratory syncytial virus infection. J. Immunol., 133 : 1925 - 1930.

Wertz G.W., Krieger M., and Ball L.A., 1989. Surface and Cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O-glycosylation. J. Virol., 63 : 4767 - 4776.

Westerbrink F., Kimman T.G., Brinkhof J.M.A., 1989. Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves. J. Gen. Virol., 70 : 591 - 601.