



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Utilisation du système combiné Transfection-infection par Vaccine recombinante T7 polymérase dans le cadre de l'étude antigénique de la protéine de fusion du BRSV

Mortier, Marie-Cécile

Award date:
1994

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.



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**Utilisation du système combiné "transfection-infection
par Vaccine recombinante T7 polymérase" dans le cadre
de l'étude antigénique de la protéine de fusion du BRSV.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques**

**Marie-Cécile MORTIER
1994**

Utilisation du système combiné "infection par la Vaccine recombinante T7 polymérase- transfection" dans le cadre de l'étude antigénique de la protéine de fusion du BRSV.

MORTIER Marie-Cécile

Résumé

Le rôle étiologique joué par le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) chez les jeunes individus justifie la mise au point de prophylaxie efficace. A ce jour, les différents vaccins disponibles n'offrent qu'une protection de courte durée. Parmi les différentes protéines exprimées par le virus, la protéine F semble la plus susceptible d'induire une protection à l'égard de l'infection par le BRSV. Dans ce contexte, la localisation des épitopes protecteurs sur cette protéine de fusion serait des plus intéressantes.

Le but de ce travail a été d'exprimer transitoirement un fragment de cette protéine F en cellules eucaryotes par un système d'infection à l'aide de Vaccine T7 (exprimant la polymérase T7)- transfection d'un plasmide porteur du gène d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur T7.

Dans un premier temps, les conditions optimales de transfection d'ADN en cellules CV1 ont été définies. La deuxième étape a consisté à cloner le gène du fragment de la protéine F (sous-unité F1) dans le vecteur d'expression pOS7. L'expression du fragment de la protéine F dans le système d'infection-transfection a été montrée par différentes techniques immunologiques. L'immunisation de souris par ce produit d'expression nous a permis de montrer que les polysera résultants étaient spécifiques du BRSV.

Les résultats obtenus lors de ce travail indiquent que cette technique d'infection-transfection pourrait être d'un grand intérêt pour la localisation d'épitopes protecteurs de la protéine F du BRSV.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : J.-J. Letesson

Liste des abréviations utilisées.

aa	acide aminé
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
β -Gal	β -galactosidase
BRSV	Virus respiratoire syncytial bovin
cf.	Comme faire
CMV	Cytomégalovirus
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
DO	Densité optique
DOPSA	(2,3-dioléyloxy-N-[2(sperminecarboxamide)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate)
DOTMA	(N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chlorure)
ECMV	Encephalomyocardisvirus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylène diamine tétra acétate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum, sérum de veau foetal
fmole	fentomole
HRSV	Virus respiratoire syncytial humain
Ig	Immunoglobuline
INF	Interféron
kD	Kilodalton
kb	Kilo paires de bases
μ g	microgramme
μ l	microlitre
mg	milligramme
midiprep	midipréparation d'ADN
miniprep	minipréparation d'ADN
ml	millilitre
mm	millimètre
NK	Cellule "Natural Killer"
ng	nanogramme
nm	nanomètre
ONPG	(o-Nitrophényl- β -d-galactopyranoside)
pb	paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN
RNase	Ribonucléase
rpm	rotations par minute
RSV	Virus respiratoire syncytial
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

Je voudrais remercier le professeur Jean-Jacques Letesson pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci à Jean-Philippe qui m'a initiée aux bases de la biologie moléculaire et cellulaires.

Merci à tous les membres de ce laboratoire pour leurs conseils judicieux et leur bonne humeur.

Merci aux membres de ma famille pour leur patience tout au long de ce mémoire.

Enfin, je voudrais remercier tout particulièrement Benoît pour ses conseils, sa patience et surtout sa présence.

Table des matières

Introduction.

Préambule.	1
1. Le virus respiratoire syncytial.	2
1.1. Taxonomie.	2
1.2. Structure du virus.	2
1.2.1. Protéines.	3
A. Les protéines non structurales.	3
B. Les protéines de la nucléocapside.	3
C. Les protéines de matrice.	4
D. Les glycoprotéines d'enveloppes.	4
1.2.2. Pathologie.	7
1.2.3. Réponse immunitaire.	8
A. Problématique du RSV.	8
B. Cinétique de la réponse immunitaire spécifique du RSV.	9
C. Immunité cellulaire spécifique du RSV.	9
D. Immunité humorale spécifique du RSV.	10
2. Identification et localisation des épitopes B sur la protéine F du BRSV.	12

But du travail.

But du travail.	16
------------------------	-----------

Matériel et méthodes.

1. Méthodes de bactériologie.	17
1.1. Plasmides.	17
1.1.1. pSV β -Galactosidase.	17
1.1.2. pCMV β -Galactosidase.	18
1.1.3. pOS7.	18
1.1.4. pJLA F'.	19
1.2. Milieux de cultures.	19
1.3. Souche bactérienne XL1-Blue.	20
1.4. Extraction d'ADN plasmidique.	20
1.4.1. Miniprep.	20
A. Solutions utilisées.	20
B. Méthode.	21
1.4.2. Midiprep.	22
A. Solutions utilisées.	22
B. Méthode.	23
1.5. Restriction enzymatique d'ADN.	24
1.6. Gel d'agarose.	25
1.7. Extraction d'un fragment d'ADN d'un gel d'agarose.	26
1.8. Ligation.	27
1.9. Transformation bactérienne.	28
1.9.1. Cellules compétentes.	28
1.9.2. Transformation.	29

1.10. Induction bactérienne à température du plasmide ρ JLA.	30
1.11. Utilisation de la technique PCR afin de produire une séquence d'ADN sous dépendance d'un promoteur T7.	30
2. Cultures cellulaires.	33
2.1. Cultures cellulaires.	33
2.1.1. Cellules.	33
2.1.2. Milieu de culture (DMEM).	33
2.1.3. Maintien de la culture.	33
2.2. Cultures virales.	34
2.2.1. Virus.	34
A. Vaccine.	34
B. RSV.	34
2.2.2. Production de virus.	34
2.2.3. Titre viral (TCID 50).	35
2.3. Transfection simple.	35
2.3.1. Technique de précipitation au CaPO_4 .	36
A. Solutions utilisées.	36
B. Méthode.	36
2.3.2. Lipides cationiques.	37
A. Transfectam.	37
B. Lipofectine.	37
C. Lipofectamine.	38
2.4. Infection-transfection.	38

2.5. Détection du produit de l'expression des DNA transfectés.	39
2.5.1. Détection immunochimique sur cellules fixées.	39
A. Fixation des cellules.	39
B. Révélation par immunofluorescence.	39
C. Marquage des noyaux au Giemsa.	40
2.5.2. Détection sur lysat cellulaire.	41
A. Lyses cellulaires.	41
B. Dosage enzymatique de la β -Galactosidase.	42
C. Dot blot.	43
D. Western blot.	44
E. ELISA indirect.	46
2.6. Immunisation.	47

Résultats.

1. Optimisation des conditions de transfections des cellules CV1.	48
1.1. Introduction.	48
1.2. Comparaison des différentes solutions permettant la transfection des cellules CV1.	49
1.3. Optimisation des conditions de transfection des cellules CV1 à l'aide de lipides cationiques.	50
1.3.1. Détermination de la quantité d'ADN optimale.	50
1.3.2. Comparaison des plasmides d'expression contenant un gène d'intérêt et des lipides cationiques entre eux.	51

2. Expression transitoire d'un fragment du gène de la protéine F du BRSV (RB 94) dans le système d'infection Vaccine T7-transfection.	53
2.1. Clonage d'un fragment du gène F dans le vecteur plasmidique pOS7.	53
2.1.1. Expression et détection d'un segment de la protéine F (F') en bactérie.	53
A. Description de la construction de pJLA-F'.	54
B. Détection de la protéine F' exprimée en bactérie.	54
2.1.2. Construction du plasmide pOS-F'.	55
2.2. Expression du gène de la protéine F' en cellules eucaryotes.	57
2.2.1. Optimisation des conditions d'infection.	57
2.2.2. Mise au point de la préparation d'antigène pour une détection au moyen de la technique de Dot blot.	58
2.2.3. Analyse de la protéine F' en Western blot.	60
2.3. Expression transitoire de fragments linéaires dans un système d'infection-transfection (Vaccine T7).	60
2.3.1. Production de séquences linéaires de différentes tailles.	61
2.3.2. Expression transitoire en cellules eucaryotes.	62
2.3.3. Expression de séquence linéaire du plasmide pOSF'.	63.
3. Etude de l'immunogénicité de la protéine F' exprimée en système transitoire.	64

Discussion.

Discussion.

66

Conclusions et perspectives.

Conclusions et perspectives.

71

Bibliographie.

Bibliographie.

Liste des abréviations utilisées.

aa	acide aminé
Ac	Anticorps
ADN	Acide désoxyribonucléique
Ag	Antigène
APS	Ammonium persulfate
ARN	Acide ribonucléique
β-Gal	β-galactosidase
BRSV	Virus respiratoire syncytial bovin
cfr.	Comme faire
CMV	Cytomégalovirus
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
DO	Densité optique
DOPSA	(2,3-dioléyloxy-N-[2(sperminocarboxamide)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate)
DOTMA	(N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride)
ECMV	Encephalomyocardisvirus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylène diamine tétra acétate
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum, sérum de veau foetal
fmole	fentomole
HRSV	Virus respiratoire syncytial humain
Ig	Immunoglobuline
INF	Interféron
kD	Kilodalton
kb	Kilo paires de bases
μg	microgramme
μl	microlitre
mg	milligramme
midiprep	midipréparation d'ADN
miniprep	minipréparation d'ADN
ml	millilitre
mm	millimètre
NK	Cellule "Natural Killer"
ng	nanogramme
nm	nanomètre
ONPG	(o-Nitrophényl-β-d-galactopyranoside)
pb	paire de bases
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, réaction de polymérisation en chaîne de l'ADN
RNase	Ribonucléase
rpm	rotations par minute
RSV	Virus respiratoire syncytial
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE	Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS
TEMED	N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

Introduction

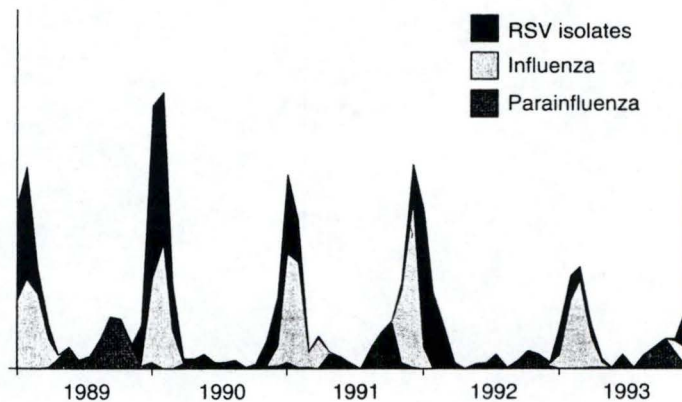


Figure 1 : Importance du HRSV au sein de principales infections virales respiratoires (Hall, 1994).

Préambule.

Isolé en 1956 chez le chimpanzé par Morris *et al.* (1956), le RSV (virus respiratoire syncytial) représente 65 % des cas de bronchiolites chez les enfants (Kuzel et Clutter, 1993). Des études sérologiques montrent que 95 % des enfants de moins de deux ans ont été infectés par le RSV humain (HRSV) et qu'un enfant sur 100 (environ 91000 aux Etats-Unis) est hospitalisé suite à cette infection (La Via *et al.*, 1992). On estime qu'en 1988 au États-Unis, le coût imputé au HRSV, atteindrait 300.000.000 \$ (Alwan *et al.*, 1994). D'autre part, la figure 1 (Hall, 1994) montre l'importance du HRSV au sein des principales infections respiratoires d'origine virale (Influenza et Parainfluenza) chez les jeunes enfants.

Il existe également un virus respiratoire syncytial qui affecte les bovidés et qui est considéré comme le principal vecteur de broncho-pneumopathies virales chez les bovidés. En 1970, Paccaud et Jacquier ont montré le lien existant entre ce virus et le HRSV. Le BRSV a alors été défini comme une espèce virale en fait très proche du HRSV. Dans le même temps, Wellemans & Leunen (1975) ont isolé la souche européenne 220/69 du BRSV (Bovine Respiratory Syncytial Virus) qui croise antigéniquement avec le HRSV. Pour l'année 1992-1993, l'Institut National Belge de Recherches Vétérinaires a dénombré 24,7 % d'animaux atteints de BRSV parmi ceux sujets à des troubles respiratoires. Lors d'une épidémie chez les bovidés, le taux de mortalité est estimé entre 20 et 30 % (Wellemans *et al.*, 1990). Lorsque l'on sait qu'aux Pays-Bas le coût moyen que constitue la mort des veaux de race laitière s'élève à 25 ECU par tête, on comprend mieux l'impact économique de cette maladie ainsi que l'intérêt de la recherche vaccinale .

1. Le virus respiratoire syncytial.

1.1. Taxonomie.

Le virus respiratoire syncytial appartient à la famille des *Paramyxoviridae*. La particule virale est constituée d'une nucléocapside hélicoïdale enveloppée dans une membrane lipoprotéique. Son génome se compose d'un ARN négatif simple brin. Au sein de cette famille, on distingue trois genres sur base de leurs activités hémagglutinante et neuraminidasique :

- Paramyxovirus (la taille du virus varie entre 150 et 200 nm) qui possède les deux activités dont le virus de Sendaï (souris) et le virus parainfluenza (humain).
- Morbillivirus (dont la taille est de 150 nm) à activité hémagglutinante (sans activité neuraminidasique) dont le virus de la rougeole (homme).
- Pneumovirus (150 à 300 nm) caractérisés par la perte de l'activité d'hémagglutination et neuraminidasique et parmi lesquels on retrouve le virus de la pneumonie de la souris (PVM), le virus de la rhinotracheite du dindon (TRT), le virus respiratoire syncytial bovin (BRSV) et le virus respiratoire syncytial humain (HRSV).

1.2. Structure du virus.

Le HRSV et le BRSV sont structurellement très proches. C'est pourquoi, tout au long de ce travail, nos descriptions se baseront principalement sur les données concernant le HRSV pour lequel la littérature fait le plus souvent référence.

Ce virus, de taille comprise entre 150 et 300 nm, se rencontre à l'extérieur des cellules sous la forme d'un noyau ribonucléoprotéique interne ou nucléocapside. Il contient un simple brin d'ARN viral entouré d'une enveloppe lipoprotéique sphérique comportant des protubérances

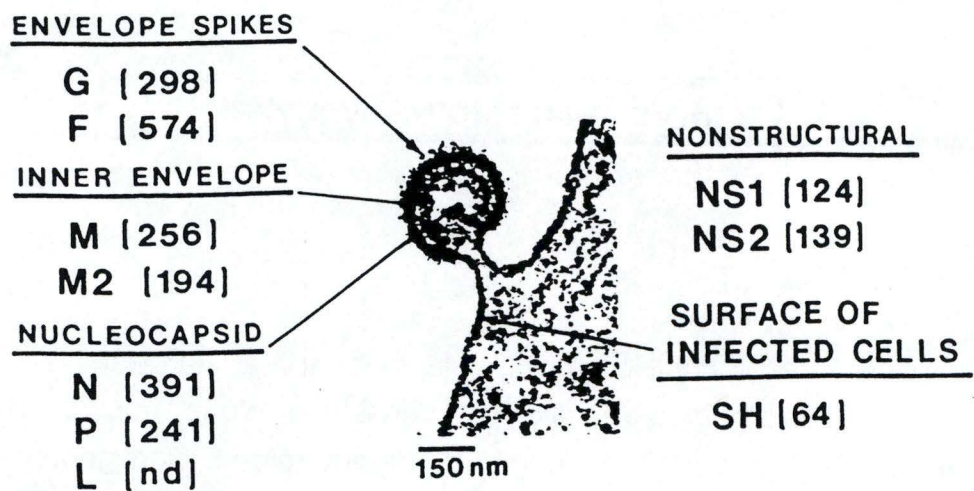


Figure 2 : Structure du RSV : micrographie d'un viron bourgeonnant utilisée pour indiquer la localisation et la taille des protéines du RSV (Mcintosh et Chanock, 1990).

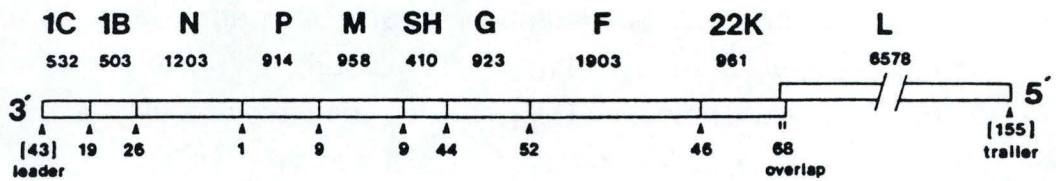


Figure 3 : Carte génétique du RSV (Collins, 1990).

responsables de l'attachement au récepteur cellulaire et de la pénétration virale dans la cellule (cfr. figure 2).

La taille du génome est d'environ 15000 nucléotides. L'ordre de succession des dix gènes (cfr. figure 3) est 3' NS₁ NS₂ N P M SH G F M₂ L 5' (notons l'existence d'un recouvrement des gènes M₂ et L). Ces 10 gènes sont transcrits durant l'infection. Chacun de ces gènes code pour une protéine différente.

1.2.1. Protéines.

Ces protéines peuvent être classées en quatre groupes selon leur localisation au sein du virus :

A. Les protéines non structurales :

- Les protéines NS₁ et NS₂ respectivement de 15,6 et 14,7 kD sont présentes uniquement dans les cellules infectées. La fonction de ces protéines non structurales est toujours inconnue.

B. Les protéines de la nucléocapside :

- La protéine N d'une masse moléculaire de 43,5 kD est responsable de la formation d'un complexe étroit avec l'ARN génomique et jouerait un rôle (tout comme les protéines P et L, voir ci-dessous) dans la transcription et la réplication de l'ARN viral (Huang & Wertz, 1983).

- La phosphoprotéine P de 27,1 kD, est relativement acide avant sa phosphorylation sur les résidus sérine. Selon Villanueva *et al.* (1994), cette protéine serait phosphorylée dans deux régions (au centre de la protéine et dans la partie C-terminale) suite à l'action d'une protéine kinase cellulaire. Elle serait la sous-unité régulatrice de l'ARN polymérase viral-ARN dépendante.

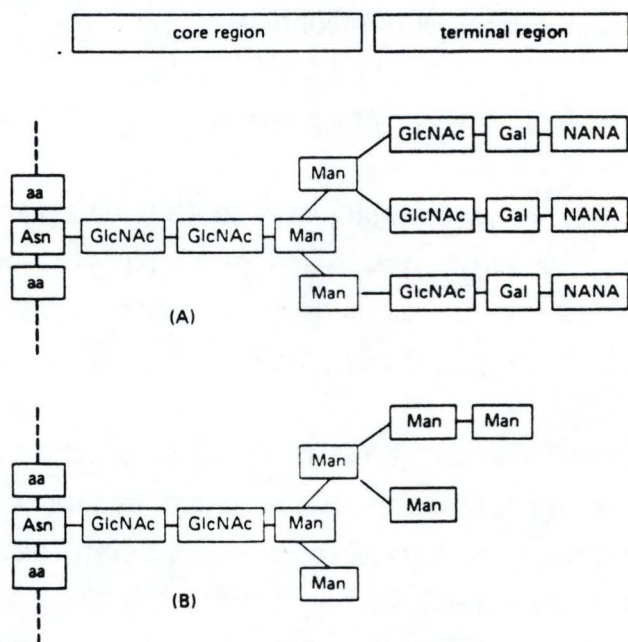


Figure 4 : Les deux classes principales d'oligosaccharide N-liés (A) et "haut mannose" (B) (Alberts *et al.*, 1990).

- La *protéine large L* de 250 kD est présente en faible quantité dans le virion et les cellules infectées. Elle serait la sous-unité principale de l'ARN polymérase. Les deux protéines L et P sont nécessaires à la synthèse d'ARN. Elles possèdent, en plus de l'activité enzymatique d'ARN polymérase-ARN dépendante, une activité de polyadénylation et de coiffage en 5' (Barik, 1993).

C. Les protéines de matrice :

- La *protéine M* de 28,7 kD, se trouve dans la couche interne de l'enveloppe virale.

- La *protéine M2 (ou 22K)* est hydrophobe et possède une masse moléculaire de 22 kD.

Il semble que la fonction structurale attribuée à la protéine M chez d'autres virus serait, chez le RSV, partagée entre les protéines associées à l'enveloppe (M et M2).

Le marquage en microscopie à fluorescence suggère que cette protéine est exprimée en surface des cellules infectées plus tard dans le cycle de l'infection (Routledge *et al.*, 1987).

D. Les glycoprotéines d'enveloppes :

- La *protéine SH* pour "small hydrophobic" (*ou 1A*) est constituée:

- d'un noyau central de 28 acides aminés hydrophobes, qui permet l'ancrage dans la membrane cellulaire,

- et de deux parties NH₂- et COOH-terminales qui contiennent des sites de glycosylations N-liées (les chaînes se fixant sur le groupement -NH₂ d'une asparagine présente dans le motif Asn-X-Ser/Thr) (cfr. figure 4).

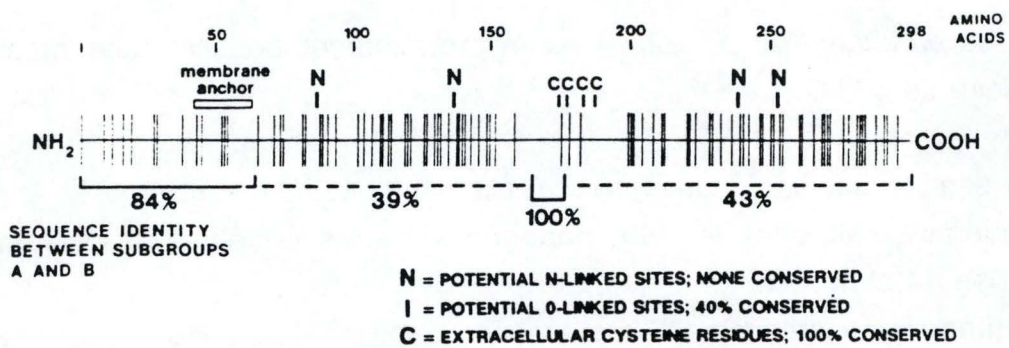


Figure 5 : Structure linéaire de la protéine G souche A2 (groupe A) et comparaison à la protéine correspondante de la souche 18537 (groupe B) (McIntosh et Chanock, 1990).

Au cours de la maturation, cette protéine est accumulée intracellulairement sous quatres formes :

- deux formes non glycosylées (de 4,8 ou 7,5 kD) qui diffèrent en longueur. L'initiation de la traduction de la forme de 4,8 kD est liée à la deuxième méthionine de la séquence peptidique.
- deux formes N-glycosylées (de 13 à 15 ou 21 à 30 kD) liées à l'existence de l'addition de chaînes N-liées.

Toutes les formes sont insérées dans la membrane cellulaire et toutes (à l'exception de la forme de 4,8 kD) sont transportées à la surface des cellules, avec leur côté COOH-terminal orienté vers l'extérieur (McIntosh & Chanock, 1990). Cette partie extracellulaire est faiblement conservée (Collins *et al.*, 1990).

La présence de la protéine SH dans l'enveloppe virale suscite encore de nombreuses questions.

- La *protéine d'attachement G* (cfr.figure 5) de 33 kD (sous sa forme native) subit une maturation intracellulaire pour aboutir à une masse moléculaire finale (estimée sur gel d'électrophorèse SDS-Page) comprise entre 84 et 90 kD. Les chaînes latérales d'hydrates de carbone sont ajoutées lors de cette maturation. On distingue deux types de glycosylation : les glycosylations O-liées sur des résidus sérine et thréonine (90 % des glycosylations sur la protéine G) et N-liées (10 %). Cette glycosylation semble indispensable à l'expression de la protéine G (Wertz *et al.*, 1989).

La protéine G comporte une zone hydrophobe du côté NH₂-terminal qui permet son ancrage dans la membrane (et qui sert également comme peptide signal selon Roberts en 1993) et une extrémité COOH-terminale orientée extracellulairement.

Le rôle de cette protéine est de permettre l'attachement du virion en surface des cellules grâce à la présence d'un récepteur non encore identifié.

La distinction entre les différents genres des *Paramyxoviridae* se situe au niveau de l'activité d'attachement. En effet, les pneumovirus dont le RSV n'ont pas d'activité d'hémagglutination ou neuraminidase à l'inverse des autres virus de cette famille. Toutefois, de récentes études ont montré que la

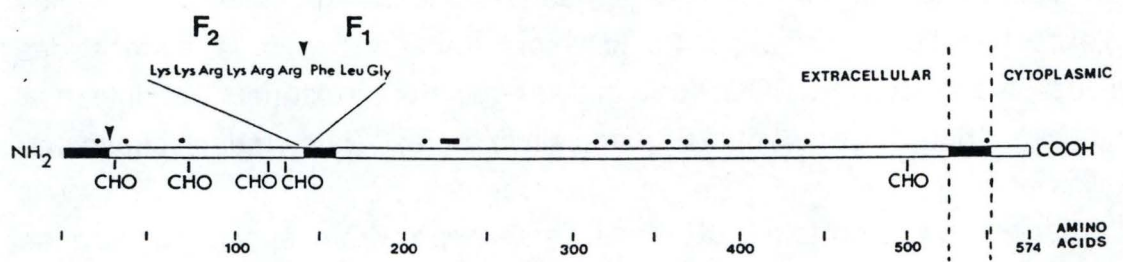


Figure 6 : Structure linéaire de la protéine F du RSV (McIntosh et Chanock, 1990).

glycoprotéine G du RSV aurait une fonction analogue à la fonction d'héماغglutination.

Outre cette caractéristique fonctionnelle, la protéine G semble également à la base d'une variation antigénique permettant de diviser le HRSV en deux sous-types A et B (Mufson *et al.*, 1985). Il semble également exister une corrélation entre l'hétérogénéité montrée par Mufson et la variabilité génétique observée au moins pour le gène G du HRSV (Wertz *et al.*, 1989).

- La *protéine de fusion F* est responsable de la "pénétration" du virus et de la formation de syncytia, c'est-à-dire que le virus fusionne avec les membranes cellulaires qui, elles-mêmes, fusionnent entre elles une fois les cellules infectées. Synthétisée sous la forme d'un précurseur F0 de 63 kD, cette protéine contient trois zones hydrophobes (cfr.figure 6) :

- un peptide signal permettant la translocation dans le réticulum endoplasmique ainsi que le clivage de la protéine.
- un peptide fusogène impliqué dans la fusion entre membranes.
- et une zone d'ancrage dans la membrane cellulaire située dans la partie COOH-terminale et servant de signal stop au transfert et à l'attachement en membrane (seuls 24 acides aminés restent dans le cytoplasme).

Ce précurseur est N-glycosylé dans le réticulum endoplasmique au niveau des sites consensus Asp-X-Ser/Thr. La sous-unité F2 comporte la majorité des sites potentiels (trois sites) de glycosylations. Un seul site potentiel de glycosylation est situé sur F1.

Le clivage du précurseur en deux sous-unités F2 (20 kD) et F1 (48 kD) a lieu dans la citerne distale du compartiment "trans" du Golgi (Collins et Mottet, 1991). Ces deux fragments sont réassociés par des ponts disulfures en membrane. La protéine clivée se présenterait en membrane sous la forme NH₂-F₂-S-S-F₁-COOH. Selon Collins et Mottet, cette expression est fonction du clivage et non pas directement de la glycosylation comme c'est le cas pour la protéine G. De plus, la protéine F formerait un hétérotétramère composé de l'association de deux hétérodimères (F₁/F₂). La sous-unité F₁ formerait principalement le noyau du tétramère et entraînerait une configuration telle

Domain of the fusion protein	RB 94/RSS-2		RB 94/18537		RSS-2/18537	
	NSH (%) [*]	AASH (%) [†]	NSH (%)	AASH (%)	NSH (%)	ASH (%)
Signal peptide	36	4	39	12	61	48
F1	77	88	77	89	84	93
F2 [‡]	73	67	71	68	81	86
F1 + F2 [‡]	76	83	76	84	83	92
Overall	75 [§]	80	75 [§]	81	82 [§]	90

* NSH, Nucleotide sequence identity (%).

† AASH, Amino acid sequence identity (%).

‡ Exclusive of the predicted signal peptide (mature protein).

§ Exclusive of the 3' terminus non-coding nucleotide sequence.

Figure 7 : Homologie entre diverse séquence de la protéine F du RSV (Walravens *et al.*, 1990).

que le peptide fusogène du côté NH₂-terminal puisse avoir un accès libre à la membrane. Heminway *et al.* (1994) proposent un mécanisme suivant lequel la conformation de la protéine F, en présence de la protéine SH, subirait un changement tel que l'activité de fusion serait possible en absence de protéine de liaison au récepteur. L'addition de la protéine G dans ce système stimulerait l'activité de fusion.

En ce qui concerne la protéine F chez le BRSV, elle fut pour la première fois clonée et séquencée (souche RB 94) par Walravens *et al.* (1990). Lorsque l'on compare la séquence déduite de l'ARN messager du gène F du BRSV (RB 94) avec les souches humaines correspondant aux deux sous-types A (RSS-2) et B (18537), on observe un pourcentage d'identité en acides aminés supérieur à 80 %. On note que cette identité en acides aminés se marque principalement sur la sous-unité F1 (88 %) plutôt que sur F2 (67 %). De plus, l'identité est plus élevée entre les deux sous-types humains (92 %) qu'entre un sous-types humain (A ou B) et la souche bovine (respectivement 83 et 84 %) (Walravens *et al.*, 1990) (cfr figure 7).

1.2.2. Pathologie.

L'infection débute le plus souvent dans les voies respiratoires supérieures où le virus reste concentré chez l'individu adulte. Le symptôme le plus courant est alors la toux. Il semble cependant que quelques cas de réinfection existent, ce qui entraîne des pathologies plus graves comme la pneumonie. Chez les jeunes individus, l'infection atteint le plus souvent les voies inférieures et plus particulièrement le poumon cranioventral (Kimman & Westenbrink, 1989 & 1990). Lorsque l'infection atteint l'épithélium bronchiolaire, les cellules épithéliales se nécrosent puis les lymphocytes, les plasmocytes et les macrophages infiltrent les bronchioles. La présence de débris cellulaires, chargés de virus, est consécutive à cette infiltration. Il s'ensuit une obstruction des voies respiratoires, marquée par la formation de collapsus et d'emphysème (La Via *et al.*, 1992).

1.2.3. Réponse immunitaire.

Une infection virale est généralement à l'origine d'une réponse immune typique antiparasite intracellulaire. A savoir, la réponse cellulaire est principalement favorisée par une réponse de type cytotoxique visant à tuer les cellules infectées. La réponse cellulaire effectrice permet l'activation du système humoral. Cette réponse humorale est marquée par la sécrétion d'anticorps (neutralisants) empêchant l'entrée du virus dans la cellule.

A. Problématique du RSV.

En général, une réponse immunitaire bien dirigée protège l'individu. Cependant, dans le cas du RSV, les mécanismes de la réponse immunitaire et ses implications restent problématiques.

Ainsi, on comprend mal l'immunopathologie des zones non infiltrées par le virus. Comment une zone non envahie par le virus peut-elle être nécrosée sans qu'aucun antigène viral ne soit présent ? En fait, les antigènes viraux sont présents uniquement dans les lobes pulmonaires cranioventraux et apicaux alors qu'une nécrose des parenchymes pulmonaires et une dégranulation des mastocytes (libérant les médiateurs de l'inflammation) est observée dans les poumons cranioventraux et craniodorsaux (Kimman & Westenbrink, 1990).

De plus, les jeunes individus les plus atteints sont ceux qui possèdent des anticorps maternels anti-RSV alors que, justement, ils devraient être plus protégés (Westenbrink *et al.*, 1989).

Dans le même sens, il est difficile d'expliquer les phénomènes de réinfections fréquentes qui peuvent parfois apparaître (Hall *et al.*, 1991).

Enfin, si la vaccination dans les années 60 de jeunes enfants avec du virus inactivé à la formaline augmente le taux d'anticorps, une augmentation des lésions pulmonaires est également observée (Piedra *et al.*, 1993).

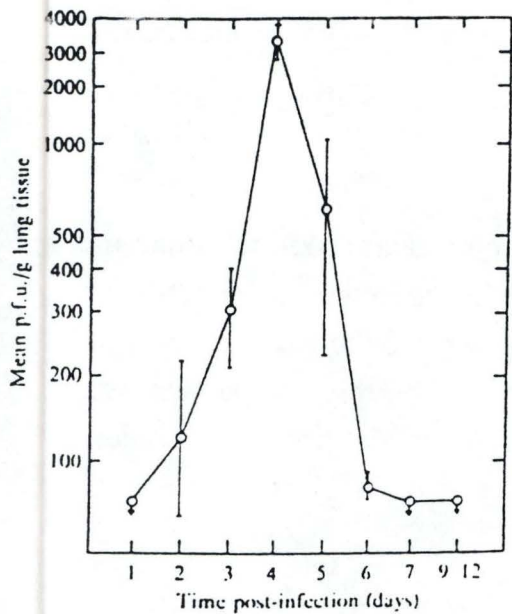


Figure 8 : Réplication du RSV dans les poumons de souris BALB/c (Anderson *et al.*, 1990).

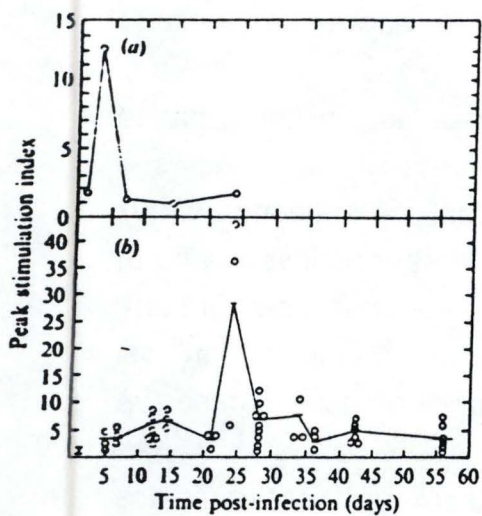


Figure 9 : Réponse lymphocytaire spécifique du virus dans les poumons (a) et dans la rate (b) (Anderson *et al.*, 1990).

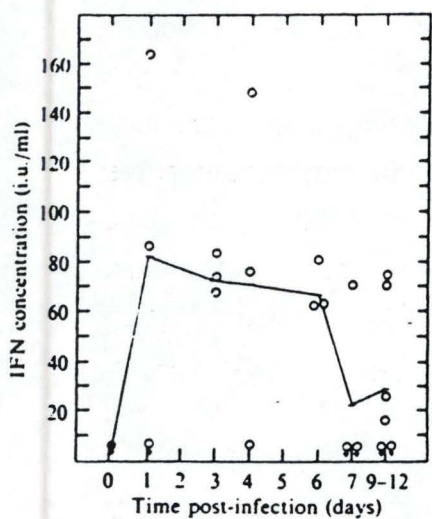


Figure 10 : Niveau d'interférons dans les poumons de souris BALB/c infectées par le RSV (Anderson *et al.*, 1990).

B. Cinétique de la réponse immunitaire spécifique du RSV.

La cinétique expérimentale d'infection par le RSV la plus complète a été réalisée chez les souris BALB/c par Anderson *et al.* (1990) :

L'infection virale (RSV) persiste jusqu'au 7ème jour avec un pic maximal au 4ème jour (cfr. figure 8).

Dès le premier jour, on voit apparaître les cellules "Natural Killer" (NK) et la synthèse d'interférons (IFN). Au troisième jour, la quantité de NK est maximale (cfr. figure 9) tandis que les IFN présentent un "plateau" jusqu'au 6ème jour avant de diminuer (cfr. figure 10).

La lyse cellulaire spécifique du RSV par l'intermédiaire de CTL (cellule T cytotoxique) se déroule principalement entre le 6ème et le 12ème jour (cfr. figure 11). Les toutes premières IgG (immunoglobulines G) apparaissent déjà le troisième jour mais ne seront vraiment présentées en grande quantité qu'entre le 24ème et le 34ème jour après l'infection (cfr. figure 12). Les IgA ne sont présents qu'à partir du 24ème jour (cfr. figure 12).

Ces résultats laissent apparaître que la réponse cellulaire (CTL) intervient principalement en primo-infection et que la réponse humorale ne trouve son intérêt que lors de réinfection (où la synthèse d'immunoglobuline est très rapide après l'infection).

C. Immunité cellulaire spécifique du RSV.

Les principales cibles de CTL de souris infectées au HRSV sont par ordre d'importance, les protéines M2, N, F, SH et 1B (Anderson *et al.*, 1990).

Le transfert passif de CTL spécifiques du RSV à des souris immunodéficientes entraîne une élimination importante de ce virus. Cependant, ces CTL semblent également être responsables d'une augmentation de la pathologie. En effet, le pic de la maladie (entre le septième et le neuvième jour) correspond à l'activité maximale des CTL (Graham *et al.*, 1991 et Alwan *et al.*, 1992).

Chez les souris BALB/c, dont la population lymphocytaire est déplétée en cellules effectrices et cytotoxiques, on observe un prolongement de la réplication virale. L'analyse histologique des tissus pulmonaires de souris

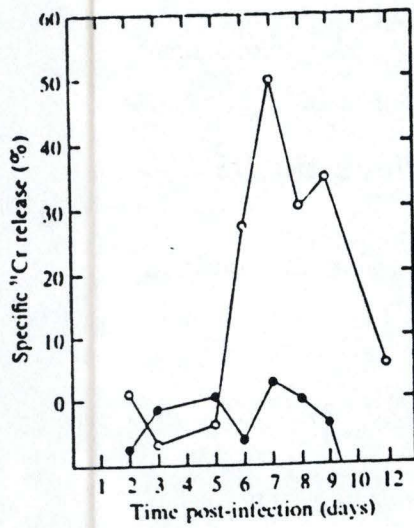


Figure 11 : Lyse médiée par les lymphocytes cytotoxiques de fibroblastes de souris BALB/c infectées par la souche A2 du RSV (○) et de cellules contrôles non-infectées (●) pendant les 12 premiers jours de l'infection (Anderson *et al.*, 1990).

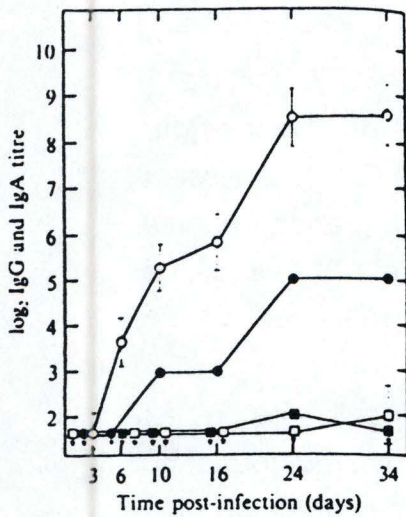


Figure 12 : Evolution de la réponse en anticorps IgA et IgG se souris BABL/c après infection intranasale avec la souche A2 du RSV (Anderson *et al.*, 1990).

déplétées en lymphocyte T cytotoxiques laisse penser que ces lymphocytes T effecteurs seraient responsables des phénomènes histopathologiques (Graham *et al.*, 1991).

D. Immunité humorale spécifique du RSV.

La réponse humorale paraît également jouer un rôle important dans l'élimination du virus.

Ainsi, le transfert passif d'IgG spécifiques des protéines d'enveloppe entraînent une diminution significative de la réplication du HRSV chez l'homme (Baker et Velicer, 1991). Le transfert passif d'anticorps spécifiques des glycoprotéines F et G du RSV à des souris immunodéficientes et infectées par le RSV induit une protection contre cette infection virale (Taylor *et al.*, 1984; Murphy *et al.*, 1990).

D'autre part, l'immunisation de souris à l'aide de protéines F et G recombinantes conduit principalement à une production d'IgG (2a et 2b) (Stott *et al.*, 1987) qui semblent jouer un rôle dans la protection.

Selon Taylor *et al.* (1992), l'activité protectrice des anticorps induit leur capacité à neutraliser l'infection virale et la lyse des cellules infectées en présence du complément. Ces anticorps protecteurs sont donc des anticorps neutralisants, c'est-à-dire capables d'empêcher la réplication virale, et/ou des anticorps inhibiteurs de fusion capable de diminuer la taille des syncytia. Néanmoins, seule la présence d'anticorps monoclonaux neutralisants et d'inhibition de fusion a pu être corrélée à une protection de souris infectées par le BRSV. Cette propriété d'inhibition de fusion des cellules infectées est seulement associée aux anticorps monoclonaux anti-protéine F.

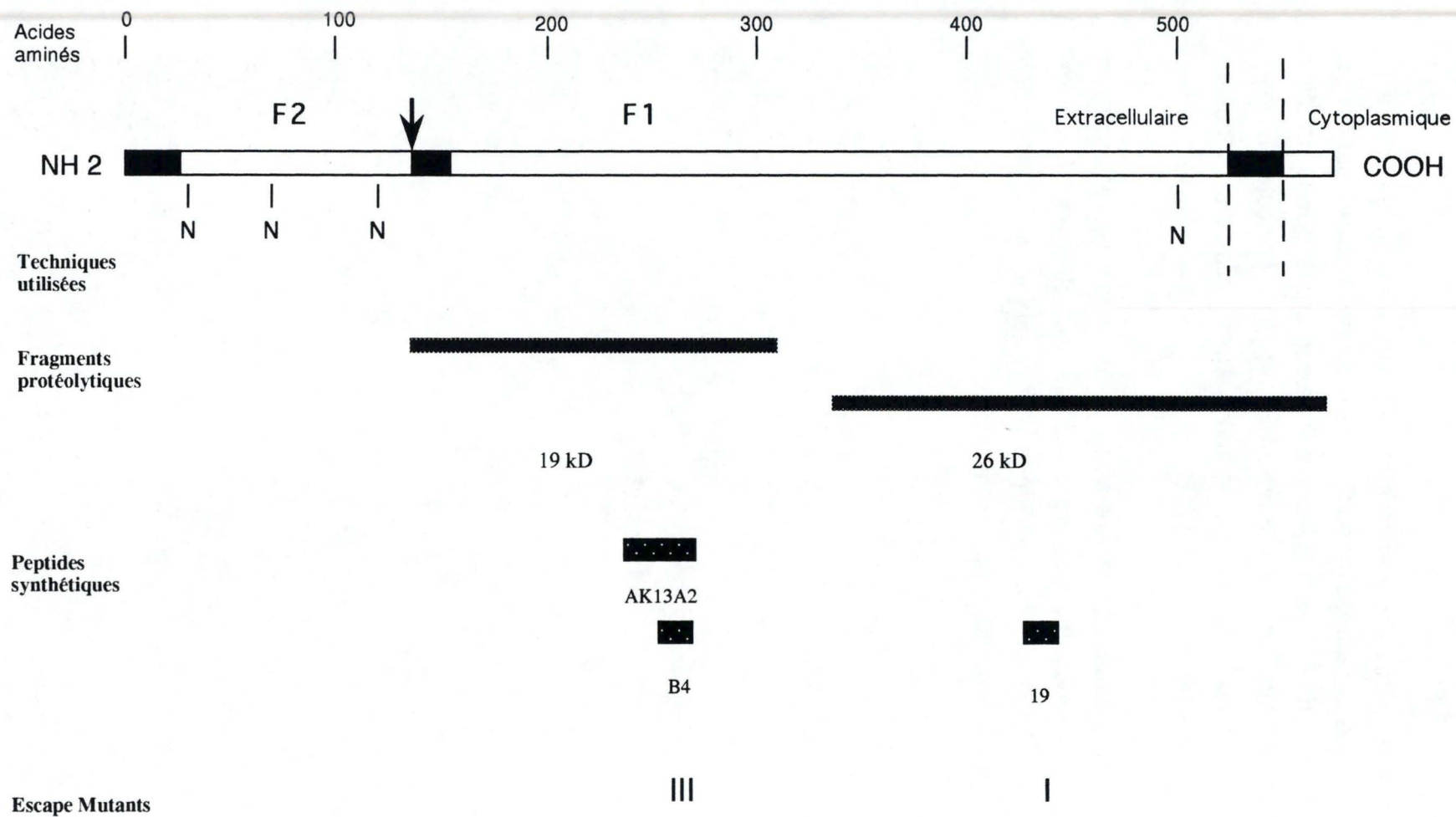
Une parenté antigénique est observée entre les protéines F des différents sous-types antigéniques des virus HRSV. Par contre, elle est absente dans le cas de la protéine G. L'étude de la protéine F en terme de protection semble donc plus intéressante.

Cependant, l'immunisation de souris par des vaccins recombinants provoque, suite à l'infection d'épreuve avec le virus vivant, des lésions pulmonaires liées à une accumulation, et à une infiltration, importante de lymphocytes et de macrophages dans les alvéoles pulmonaires (Stott *et al.*, 1987; Wathen *et al.*, 1991; Connors *et al.*, 1991a et b; Vaux-Perez *et al.*, 1992). Ce type de réaction

est également caractéristique de la vaccination à l'aide de virus inactivé à la formaline. Il semble que la réponse immunitaire soit en déséquilibre surtout en ce qui concerne la protéine F. Ces résultats nous laisse croire que la protéine est capable d'induire des anticorps protecteurs et non protecteurs mais semble aussi impliquée dans les phénomènes histopathologiques (Alwan *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1991).

Il serait donc intéressant de mettre au point un vaccin protecteur sans les désavantages immunopathologiques observés actuellement. Dans ce cadre, il est important d'identifier les épitopes responsables de la protection afin de produire une réponse humorale protectrice.

Figure 13 : Schéma recapitulatif de l'ensemble des épitopes neutralisants localisés avec précision sur la protéine F du RSV.



2. Identification et localisation des épitopes B sur la protéine F du BRSV

Un épitope est le site d'une molécule antigénique spécifiquement reconnue par les parties variables d'un récepteur lymphocytaire. L'épitope B, de nature protéique, lipidique ou nucléotidique est le site d'une molécule antigénique reconnue par le paratope d'un Ac. Le paratope étant la portion de l'Ac physiquement en contact avec l'épitope d'un antigène (Greenspan, 1992). Il est reconnu par les anticorps (libres ou en membrane des lymphocytes B) et peut se présenter sous une forme linéaire (continue) ou discontinu.

Les anticorps potentiellement protecteurs (sur base de leurs activités fonctionnelles *in vitro*) ayant été sélectionnés, il convient dans un premier temps de rechercher les zones immunodominantes sur la protéine cible, c'est-à-dire de grouper les anticorps en fonction de la zone antigénique qu'ils reconnaissent. Pour ce faire, des tests d'immunocompétition entre ces différents anticorps ont été réalisés. Quatre (à cinq) sites ont pu être mis en évidence sur la protéine F (Garcia-Barreno *et al.*, 1989; Beeler & van Wyke Coelingh, 1989).

Ce système de classification d'anticorps monoclonaux en domaines antigéniques ne permet toutefois pas de localiser ces zones sur la séquence de la protéine-cible.

Dans un deuxième temps, la zone physique de l'épitope reconnue par la protéine est déterminée le plus précisément possible.

Plusieurs laboratoires travaillant sur le RSV se sont intéressés à la localisation précise d'épitopes B sur la protéine F et cela à l'aide de différentes techniques.

A partir d'un ensemble d'anticorps neutralisants monoclonaux anti-protéine F, le groupe de Melero (Madrid) est parvenu à localiser grossièrement le site de fixation d'anticorps monoclonaux spécifiques de deux domaines différents (cfr. figure 13). Après un clivage protéolytique de la protéine F, il a observé que les anticorps d'un site particulier se lient à un fragment de 19 kD (AK13A2, B4 et 47F). Le séquençage NH₂-terminal de ce fragment a permis de le situer dans la partie NH₂-terminale de la sous-unité F1. De même, les anticorps spécifiques d'un autre site antigénique (19 et 20) reconnaissent un fragment de 26 kD situé dans la partie COOH-terminale de la protéine

(Arbiza *et al.*, 1992). Bien que cette technique permette l'utilisation d'enzymes différents, elle garde cependant ses limites. D'une part, elle reste liée à la séquence protéique, au type d'enzyme et à l'accessibilité des sites sur la protéines. D'autre part, le mapping fin est difficilement envisageable par cette technique.

Une localisation plus précise de chacun de ces épitopes a été effectuée suite à l'isolement d' "escape mutants". Cette technique permet de sélectionner les virus mutants échappant à la neutralisation par les anticorps monoclonaux-cibles. L'analyse de la séquence du gène d'intérêt chez le mutant permet d'identifier des bases modifiées par rapport à la souche sauvage et donc d'en déduire les acides aminés (aa) importants pour la fixation sur la protéine-cible des anticorps.

Dans le cas de la protéine F du RSV, les nucléotides mutés sont principalement situés dans deux régions de la séquence en aa suivant l'anticorps utilisé pour la sélection. La zone située entre les aa 262 et 272 semble importante pour la fixation des anticorps AK13A2, B4 et 47F. Par contre, la mutation de l'acide aminé 429 est suffisante pour empêcher la fixation des anticorps 19 et 20 sur leurs sites antigéniques.

Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation de peptides synthétiques recouvrant les zones définies par l'utilisation d' "escape mutant". L'Ac B4 reconnaît un peptide de dix aa (255 à 275) alors que l'Ac 19 reconnaît la zone située entre les aa 422 et 438 (Arbiza *et al.*, 1992).

De même, l'anticorps inhibiteur de fusion AK13A2 a été localisé entre les résidus 235 et 275 (López *et al.*, 1993).

L'immunisation de lapins par ces peptides synthétiques a été réalisée afin de déterminer la pertinence biologique de ces zones. Même si une réponse contre ces peptides est détectée, la protéine native F n'est que pauvrement reconnue. De plus, aucune séroneutralisation du RSV n'est observée (López *et al.*, 1993).

Sur base de la synthèse de courts peptides (pepscan), d'autres études ont été réalisées par diverses groupes. La technique du pepsan (Geysen *et al.*, 1987) permet de mapper des épitopes linéaires suite à la synthèse de peptides sur support de polyéthylène. Ces peptides, se chevauchant sur plusieurs aa, permettent de balayer l'ensemble de la

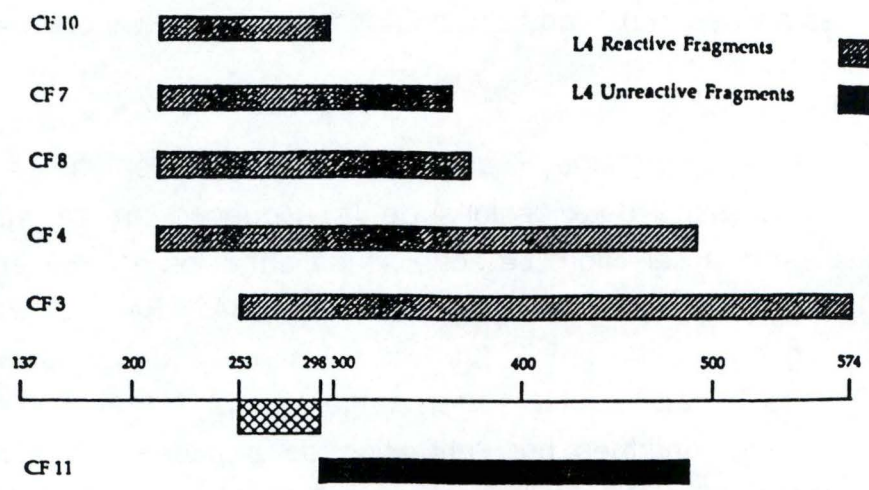


Figure 14 : Schéma des six fragments se chevauchant (Martin-Gallardo *et al.*, 1991).

séquence d'intérêt et d'évaluer la réactivité d'anticorps monoclonaux par ELISA sur ces peptides.

Dans notre laboratoire, l'utilisation de cette technique a permis de localiser l'épitope reconnu par l'anticorps AK8B5 (neutralisant et inhibiteur de fusion) entre les résidus 467 et 476.

Un épitope linéaire de 10 acides aminés (173 à 182) a également été identifié par l'équipe de Kramps (Lelystad, travaux non publiés).

Cependant, une des limites de cette technique est due aux contraintes hydrophobes qu'engendrent les supports de polyéthylène. Les résultats obtenus requièrent donc une vérification subséquente par d'autres techniques comme les peptides solubles.

Les techniques utilisées jusqu'à présent, ont permis de localiser précisément les sites antigéniques reconnus par trois anticorps. Cependant, la majorité des épitopes n'ont pu être mappés précisément par ces techniques. Cela nous laisse croire que la majorité des épitopes importants dans la protection ne sont pas représentés par de courtes séquences en aa ou sont discontinus.

Une approche alternative intéressante pour localiser les épitopes est basée sur l'expression par génie génétique de fragments protéiques. Le gène ou un fragment de ce gène particulier (de séquence connue) est inséré au sein d'un plasmide (et parfois est mis en fusion avec un gène reporter tel que la β -galactosidase). Le produit du plasmide peut ainsi être surexprimé et détecté par différents anticorps monoclonaux.

Au niveau du RSV, le groupe de Paradiso a exprimé six fragments recombinants de F1 qui se chevauchent. Par recoupement des résultats obtenus, l'épitope reconnu par l'anticorps L4 a été localisé entre les résidus méthionine 289 et alanine 298 (Martin-Gallardo *et al.*, 1991) (cfr. figure 14).

Lounsbach *et al.* (1993) ont exprimé une protéine de fusion (avec la β -gal) dans *E. Coli*. Cette protéine est reconnue par deux anticorps neutralisants et inhibiteurs de fusion (1E3 et RS348). La zone de l'épitope est localisé entre les aa 253 à 289. Cependant, l'immunisation de souris avec un fragment de 129 aa (253 à 384), recouvrant la zone reconnue, n'induit pas d'Ac spécifiques de la forme native de la protéine. De plus, le sérum obtenu ne permet pas de neutralisation virale

Nous avons joint la figure 13 qui décrit l'ensemble des épitopes neutralisants localisés avec précision sur la protéine F du RSV.

But du travail

But du travail.

Le rôle prépondérant joué par le BRSV dans les infections respiratoires des jeunes bovidés, justifie la mise au point de moyens de prophylaxie efficaces. Ceci est d'autant plus vrai que les vaccins disponibles sont peu efficaces et n'induisent qu'une immunité de courte durée.

La majorité des anticorps protecteurs (principalement dotés d'activités neutralisantes et inhibitrices de fusion) sont dirigés contre la protéine F. Néanmoins, cette protéine semble également constituée d'épitopes non protecteurs responsables des lésions immunopathologique.

Il serait donc intéressant de localiser les épitopes protecteurs sur la séquence de la protéine F. A ce jour, seuls quatre épitopes ont pu être localisés précisément. Malheureusement, l'immunisation à l'aide de ces peptides couvrant ces zones n'induit pas de neutralisation virale *in vitro*.

Une alternative originale pourrait être la localisation d'épitopes sur des fragments protéiques de tailles plus importantes. L'augmentation de la taille pourrait également permettre de tenir compte de la conformation du fragment. Il faut rappeler que la majorité des épitopes B sont discontinus. A ce titre, l'expression de ces fragments en cellules eucaryotes nous permettra de nous rapprocher le plus possible des conditions de maturations rencontrées *in vivo*.

Le but de ce travail est de mettre au point un système d'expression transitoire d'un fragment de la protéine F en cellules eucaryotes par infection Vaccine T7-transfection.

Ce système consiste à :

- infecter des cellules avec la Vaccine T7 (*Poxviridae*) exprimant la polymérase du bactériophage T7 dans le cytoplasme cellulaire.
- transfecter ensuite ces mêmes cellules à l'aide d'un plasmide pOS7 dans lequel un gène d'intérêt a été cloné. Ce gène est alors sous dépendance d'un promoteur et d'un terminateur T7 (reconnu par la polymérase T7). Une séquence non traduite (ECMV) a été insérée en amont du gène permettant ainsi une meilleure traduction.

**Matériel
et
méthodes**

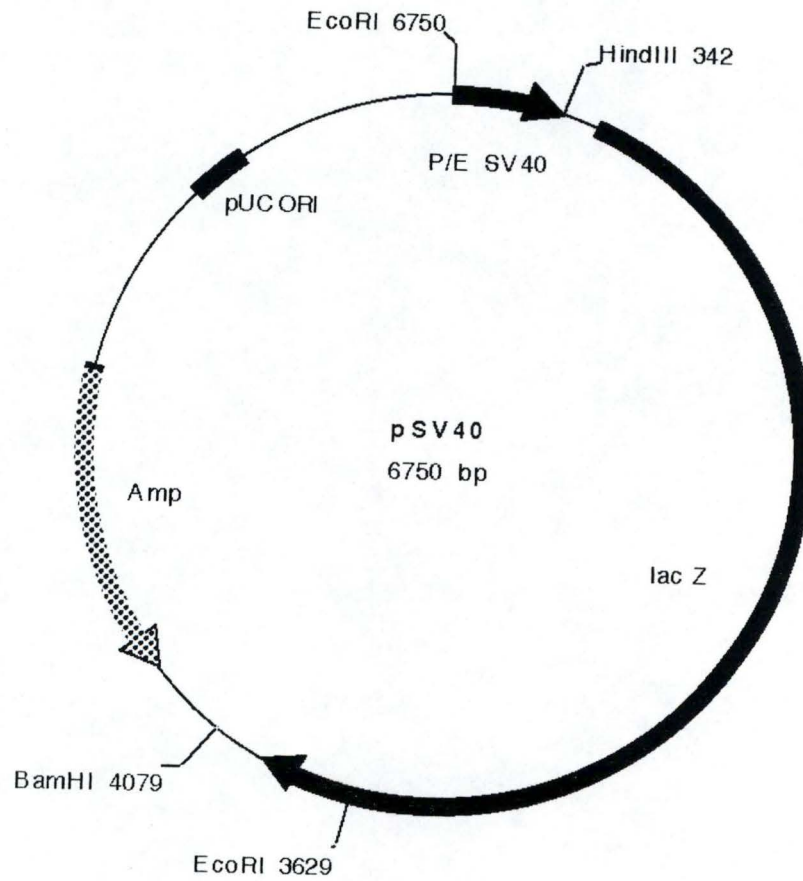


Figure 15 : Carte du plasmide pSV β Galactosidase (Promega).

1. Méthodes de bactériologie.

1.1. Plasmides.

Les plasmides sont les outils de base des manipulations génétiques. Lors de ce travail, nous avons principalement utilisé les plasmides suivants :

1.1.1. pSV β Galactosidase (Promega) (cfr. figure 15).

Ce plasmide de 6300 paires de bases (6,3 Kb) est souvent utilisé comme vecteur "reporter" pour la transfection de cellules de mammifères. Il dispose :

- des séquences nécessaires à sa réplication et à sa sélection en bactérie *E. coli*, c'est-à-dire une origine de réplication (ORI) et un marqueur de sélection à l'ampicilline (β -lactamase) originaire du transposon Tn 3.
- d'un gène "reporter" Lac Z appartenant à l'opéron lactose du chromosomes d'*E. coli*. L'enzyme β -galactosidase ainsi synthétisée hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Elle est facilement détectable grâce à l'hydrolyse qu'elle engendre à partir de substrats chromogéniques tels que l'ONPG (o-NITROPHENYLb-d-GALACTO-PYRANOSIDES).
- la transcription du gène Lac Z (présent sur ce plasmide) au sein des cellules eucaryotes est rendue possible grâce à la présence d'un promoteur EARLY SV40 ainsi que d'un enhancer. Ce promoteur est issu du "Polyomavirus Simian 40" dont l'espèce-cible est le singe. Pour rappel, l'ADN est divisé en gènes EARLY codant des antigènes (Ag) T (small et large) et en gènes LATE codant les protéines de la capsid virale. L'intégration de l'ADN viral au sein du génome de l'hôte est fréquente. Beaucoup de cellules de mammifères sont ainsi capables de synthétiser l'Ag T (Maniatis, 1989).

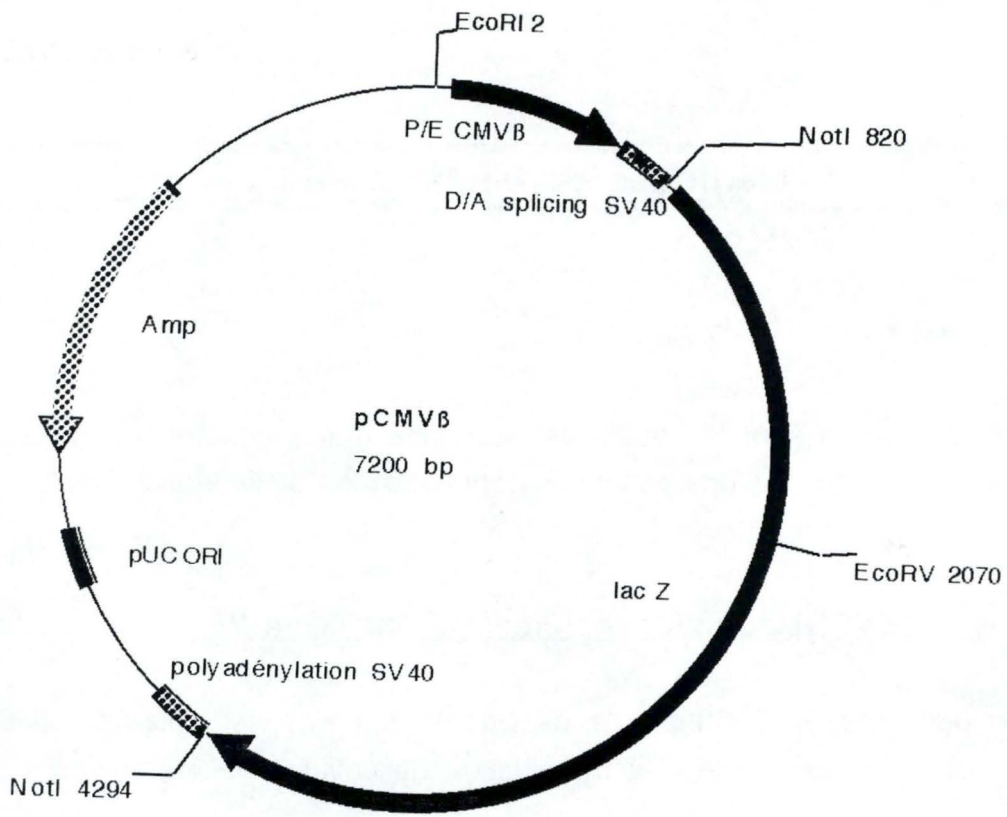


Figure 16 : Carte du plasmide pCMVBGalactosidase (Clontech).

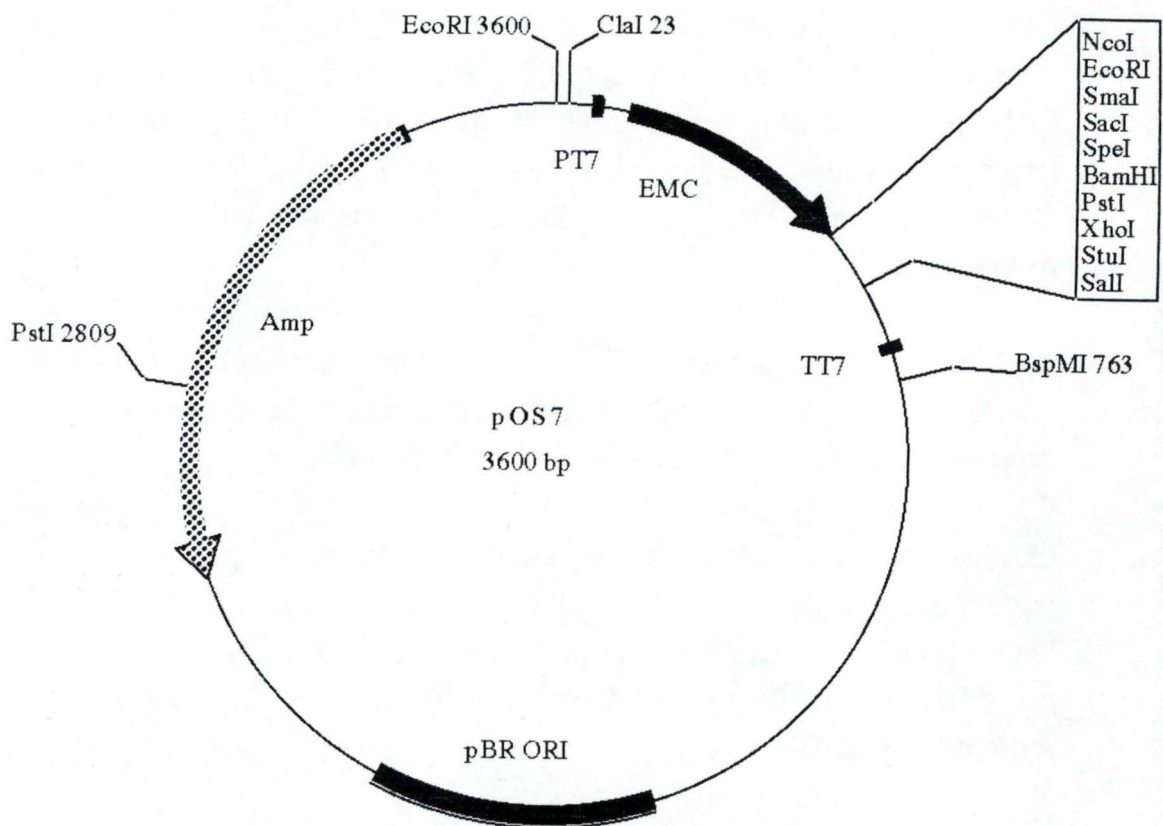


Figure 17 : Carte du plasmide pOS7 (Moss).

1.1.2. pCMV β Galatosidase (Clontech) (cfr. figure 16).

Ce plasmide de 7,2 kb est également utilisé comme vecteur "reporter" en cellules eucaryotes. Il dispose :

- des séquences nécessaires à sa réplication et à sa sélection dans *E. coli*.
- d'un promoteur EARLY du gène du cytomégalovirus (CMV) permettant l'expression de la β -galactosidase au niveau des cellules de mammifères ainsi qu'un site de "splicing" du RNA et un signal de polyadénylation issu de SV40. Tout ceci permet de recréer les conditions optimales de stabilité de l'ARN chez les cellules eucaryotes.

1.1.3. pOS7 (cfr. figure 17).

Ce plasmide fournit par B.Moss est composé de 3,6 kb. Il est issu de pBR322 et est utilisé en expression transitoire dans un système d'infection-transfection. Il dispose :

- des séquences nécessaires à sa réplication et à sa sélection dans *E. Coli* (pBR322).
- des séquences de transcription en cellules eucaryotes, à savoir :
 - un promoteur T7 activé par le produit du gène de la polymérase du bactériophage T7 intégré dans le génome de la Vaccine.
 - un terminateur de transcription T7.
 - une région non traduite (long untranslated region) issu du ECMV (encephalomyocarditisvirus) qui permet la traduction indépendamment du "capping". On peut ainsi obtenir dans un système eucaryotique de l'ARN bactérien plus stable et dont l'expression est multipliée par 5 à 10 fois.

Tout comme le pBR322, ce plasmide se réplique faiblement et n'est pas partagé équitablement lors de la division bactérienne. Différentes techniques

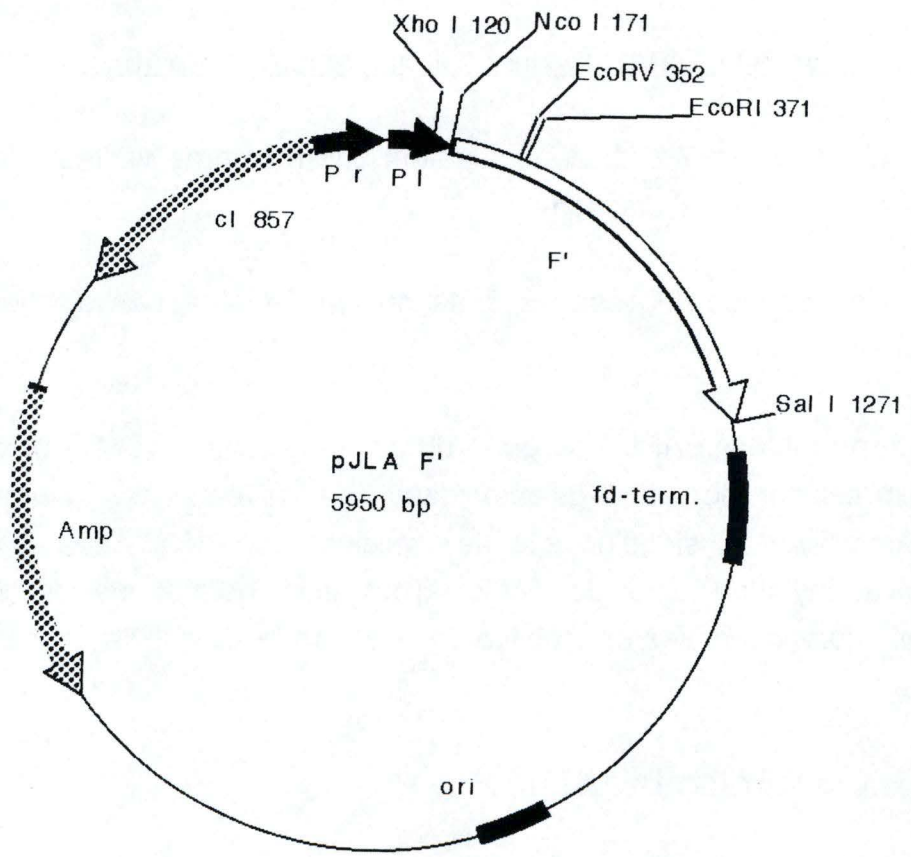


Figure 18 : Carte du plasmide pJLA-F' (CER Marloie).

sont utilisées pour améliorer la production du plasmide (Maniatis,1989). Nous en parlerons au fur et à mesure de la description des méthodes utilisées.

1.1.4. pJLA F' (cfr. figure 18).

Ce plasmide de 6 Kb a été à la base de notre clonage du fragment du gène F (correspondant à la sous-unité F1 du gène F du BRSV de la souche RB-94 et exempt de la région codante pour le peptide fusogène et de la zone d'ancrage). Ce fragment contient les nucléotides 464 à 1567 du gène de la protéine F et a été cloné entre les sites *Nco1* et *BamH1* du plasmide pJLA-502 (Schauder *et al.*, 1987). Cette construction a été mise à notre disposition par le C.E.R. de Marloie.

Il dispose des séquences nécessaires à sa réplication et à sa sélection en bactérie (ampicilline). La transcription du gène d'intérêt est sous dépendance des promoteurs en tandem PR et PL du bactériophage λ ainsi qu'un terminateur du bactériophage fd. La transcription de ce gène est réprimée par la protéine clts S57 du bactériophage λ à une température comprise entre 28 et 30 °C tandis qu'elle est induite à 42 °C.

1.2. Milieux de culture.

Pour un litre de milieu riche NZYM liquide :

NZ amine (tryptic soy broth, Difco)	10 g
NaCl	0,034 M
Yeast extract pour bactéries (Gibco BRL)	5 g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,008 M

Pour le milieu solide, on ajoute 15 g de Bacto-agar (Difco) par litre.

Après autoclave, pour obtenir un milieu sélectif, on ajoute, au milieu refroidi l'ampicilline à une concentration finale de 100 μ g par ml.

Pour la conservation des bactéries, on les resuspend dans une solution composée de 85 % de milieu NZYM liquide pour 15 % de glycérol et on les met à - 70 °C.

1.3. Souche bactérienne XL1-Blue.

Ces cellules sont caractérisées par les propriétés suivantes :

- end A1 qui diminue la concentration d'endonucléases et permet ainsi d'améliorer le rendement et la qualité des préparations d'ADN.
- rec A1 qui diminue fortement le taux de recombinaison du DNA endogène-exogène.
- lac- qui est la délétion de l'opéron lactose et qui rend la bactérie incapable de métaboliser le lactose.
- Tn 10 qui confère la résistance à la tétracycline
- lacIq ZMD 15 qui permet la sélection par un test "bleu-blanc".

1.4. Extraction d'ADN plasmidique.

1.4.1. Miniprep.

Cette méthode permet d'extraire l'ADN à partir de cultures de faibles volumes.

A. Solutions utilisées :

- Tampon P1 :

RNAse	100 µg/ml.
Tris-HCl	50 mM, pH 8,0.
EDTA	10 mM.

- Tampon P2 :

NaOH	200 mM.
SDS	1 %.

- Tampon P3 :
KoAC 3 M, pH 5.
- Ethanol 70 %.
- Isopropanol.
- Phénolchloroforme (phénol : Sigma, Chloroforme : UCB).

B. Méthode :

- Inoculer 2 ml de milieu NZY (ampicilline) avec une colonie bactérienne.
- Incuber une nuit à 37 °C sous agitation.
- Récupérer 1,5 ml de culture bactérienne.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de P1-RNase.
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger lentement.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 et agiter doucement.
- Laisser 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 500 µl de phénolchloroforme.
- Vortexer 10 à 15 secondes.
- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer la phase aqueuse (phase supérieure dans ce cas).
- Précipiter l'ADN avec 500 µl d'isopropanol.
- Centrifuger 20 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 70 % et agiter doucement.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Eliminer le surnageant
- Sécher.
- Resuspendre dans 40 µl d'H₂O.

- Tampon P3 :
KoAC 3 M, pH 5.
- Ethanol 70 %.
- Isopropanol.
- Phénolchloroforme (phénol : Sigma, Chloroforme : UCB).

B. Méthode :

- Inoculer 2 ml de milieu NZY (ampicilline) avec une colonie bactérienne.
- Incuber une nuit à 37 °C sous agitation.
- Récupérer 1,5 ml de culture bactérienne.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Resuspendre le culot bactérien dans 300 µl de P1-RNase.
- Ajouter 300 µl de P2 et mélanger lentement.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de P3 et agiter doucement.
- Laisser 10 minutes sur glace.
- Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 500 µl de phénolchloroforme.
- Vortexer 10 à 15 secondes.
- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer la phase aqueuse (phase supérieure dans ce cas).
- Précipiter l'ADN avec 500 µl d'isopropanol.
- Centrifuger 20 minutes à température ambiante.
- Eliminer le surnageant.
- Ajouter 1 ml d'éthanol 70 % et agiter doucement.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Eliminer le surnageant
- Sécher.
- Resuspendre dans 40 µl d'H₂O.

Lorsque l'on travaille avec un plasmide du type pBR322 (low replication), on utilise 3 ml de culture bactérienne et la phase phénol/chloroforme est supprimée (la préparation sera ainsi moins pure mais la perte de matériel est moindre). On peut également augmenter le temps de culture.

1.4.2. Midiprep.

Cette méthode permet une extraction d'ADN en grande quantité et à un taux de purification appréciable.

A. Solutions utilisées :

- Tampon S1 :

Tris-HCl	50 mM, pH 8
EDTA	10 mM
RNAse	100 µg/ml

- Tampon S2 :

NaOH	200 mM
SDS	1 %

- Tampon S3 :

KoAC	2,6 mM, pH 5,2
------	----------------

- Tampon N2 :

Tris-HCl	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	500 mM
Ajuster avec H ₃ PO ₄ à pH 6,3	

- Tampon N3 :

Tris-HCl	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1150 mM
Ajuster avec H ₃ PO ₄ à pH 6,3	

- Tampon N5 :

Tris-HCl	100 mM
Ethanol	15 %
KCl	1 M
Ajuster avec H ₃ PO ₄ à pH 8,5	

- Colonne AX 100 (Nucléobond)

- Isopropanol

- Ethanol 70%

B. Méthode :

- Mettre en préculture des bactéries dans 30 ml de milieu NZYM-ampicilline.
- Incuber 5 heures à 37 °C sous agitation.
- Prélever de 500 µl à 1,5 ml de cette préculture et ajouter jusqu'à 150 ml de milieu NZYM (+ ampicilline).
- Incuber une nuit à 37 °C sous agitation.
- Centrifuger 15 minutes à 4000 rpm (Jouan CR 412).
- Resuspendre le culot de cellules dans 4 ml de S1.
- Incuber 5 minutes à température ambiante.
- Ajouter 4 ml de S2.
- Incuber 10 minutes à température ambiante
- Ajouter 4 ml de S3.
- Incuber 10 minutes à 4 °C.
- Centrifuger 20 minutes à 12000 rpm (Sorvall, rotor SS34).
- Centrifuger une deuxième fois le surnageant
- En parallèle, équilibrer la colonne AX 100 avec 2 ml de N2.
- Verser le surnageant sur la colonne.
- Laisser traverser par gravité.
- Laver avec 2 x 4 ml de N3.
- Eluer avec 2 ml de N5.
- Eliminer les 350 premiers µl (volume mort).
- Récupérer 1,650 ml de solution.

- Ajouter 1350 μ l d'isopropanol aux 1650 μ l de solution.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Eliminer le surnageant.
- Sécher.
- Resuspendre dans 75 μ l d'H₂O.

Pour la production de plasmides issus de pBR322, après 2 heures de culture, on mesure la densité optique à 600 nm. Lorsque celle-ci atteint 0,4, on ajoute du chloramphénicol à une concentration finale de 170 μ g par ml (concentration solution stock : 34 mg par ml). Le chloramphénicol se lie à la sous unité 50S du ribosome empêchant toute synthèse protéique. La division bactérienne est ainsi inhibée sans pour autant empêcher la multiplication du plasmide (Maniatis, 1990).

1.5. Restriction enzymatique d'ADN.

Ceci consiste à utiliser des endonucléases de restriction reconnaissant une séquence (en général 4 à 6 bp et se présentant sous la forme d'un palindrome) précise de l'ADN qui la coupe à un endroit déterminé (soit en bouts francs soit en bouts 5' ou 3' protrudants).

La restriction se fait en présence :

- d'ADN.
- de tampon de restriction adéquat (concentration finale 1x).
- d'enzyme dont la quantité utilisée dépend du nombre de sites présents dans les séquences et du type de DNA élué. Son volume ne doit cependant jamais excéder 1/10 du volume final.
- d'eau stérile.

Incuber 2 heures à la température adéquate (le plus souvent à 37 °C).

Suivant le type d'enzyme, la réaction peut être inhibée par dénaturation à haute température ou par l'utilisation de composé chimique (EDTA).

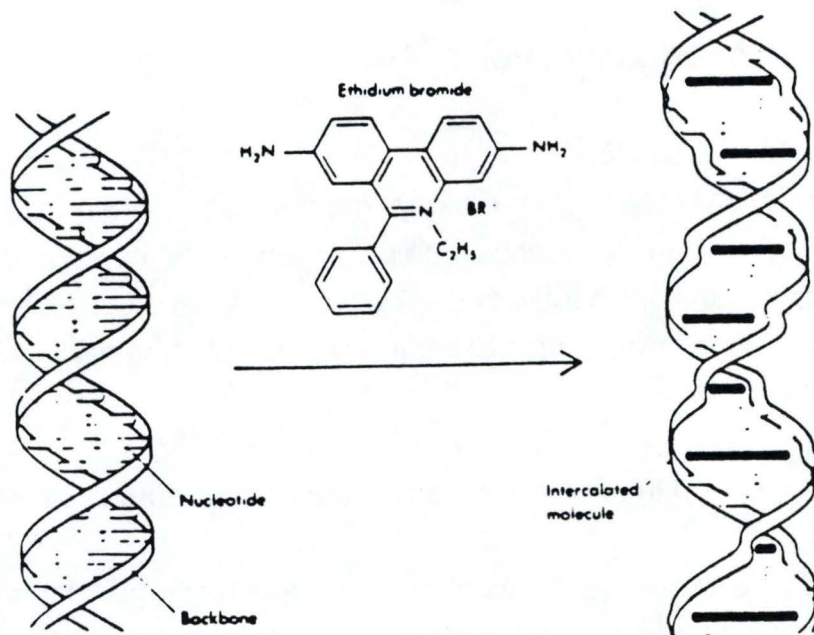


Figure 19 : Représentation schématique montrant les molécules de bromure d'éthidium s'insérant entre les bases azotées de l'ADN.

Afin de réaliser une seconde restriction avec un tampon différent :

- Porter le volume à 100 μ l minimum avec de l'eau.
- Ajouter de 0,1 volume de NaCl 5M et 2,5 volumes d'éthanol.
- Incuber 30 minutes à -70 °C.
- Centrifuger 30 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Laver à l'éthanol 70 %.
- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Sécher sous vide.
- Resuspendre le culot dans la quantité d'eau nécessaire à la nouvelle restriction.

1.6. Gel d'agarose.

L'analyse de la taille de fragments d'ADN est réalisée sur gel d'agarose.

L'ADN chargé négativement migre dans un gel d'agarose de l'électrode négative vers la positive sous l'action d'un champ électrique. La vitesse de migration est fonction du poids moléculaire du fragment, de la conformation de l'ADN (super-enroulée ou CCC et circulaire cassée sur un seul brin OC ou sur les deux brins OL), du voltage imposé et de la concentration en agarose.

Tampon TAE 50 x (pour un litre) :

Tris-HCl	2 M
Acide acétique glacial	37,1 ml
EDTA 0,5 M, pH 8	100 ml

Alourdisseur 10 x :

Glycérol	50 %
Na ₂ -EDTA	100 mM, pH8
SDS	1 %
Bleu bromophénol	0,1 %

Bromure d'éthidium (cfr. figure 19).

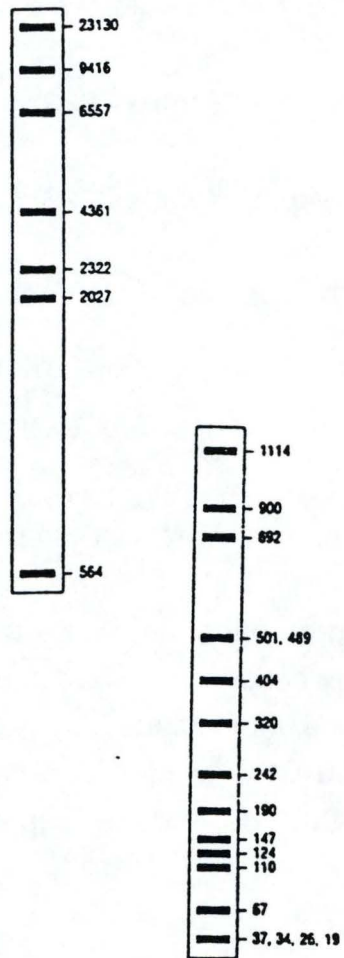


Figure 20 : Etalon 2 et 8. La taille de chaque fragment d'ADN est donnée en paire de base.

L'agarose est ajouté au TAE 1 x, porté à ébullition, refroidi et coulé. On ajoute ensuite du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 µg/ml. Le gel est immergé dans la cuve contenant du tampon TAE 1 x et les échantillons (auxquels on ajoute préalablement l'alourdisseur à une concentration finale de 1/10 du volume final) sont déposés dans les puits. Parallèlement, on fait migrer un marqueur de poids moléculaire (Boerinhger, cfr. figure 20) dont on connaît la taille des différents fragments ainsi que la quantité d'ADN. Par extrapolation on pourra ainsi déduire la taille des fragments étudiés ainsi que la quantité d'ADN présent.

1.7. Extraction d'un fragment d'ADN d'un gel d'agarose (Gene Clean II Kit Bio 101 Inc.).

Par cette méthode, nous pouvons extraire le fragment d'ADN désiré du gel d'agarose.

Solution NEW :

Solution du kit (NaCl, Tris et EDTA)	7 ml
H ₂ O distillée	140 ml
Ethanol absolu	165 ml

Méthode :

- Exciser les bandes du gel.
- Ajouter 3 volumes de NaI 6 M (1,5 ml).
- Chauffer 5 à 10 minutes à 56 °C jusqu'à dissolution complète de l'agarose.
- Ajouter 10 µl de Glass milk.
- Placer 30 minutes à 4 °C en agitant toutes les 5 minutes.
- Centrifuger 15 secondes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Resuspendre dans 1 ml de tampon NEW.
- Centrifuger 15 secondes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Laver 2 fois suivant la même procédure.
- Centrifuger 15 secondes à 12000 rpm (Hermle Z229).

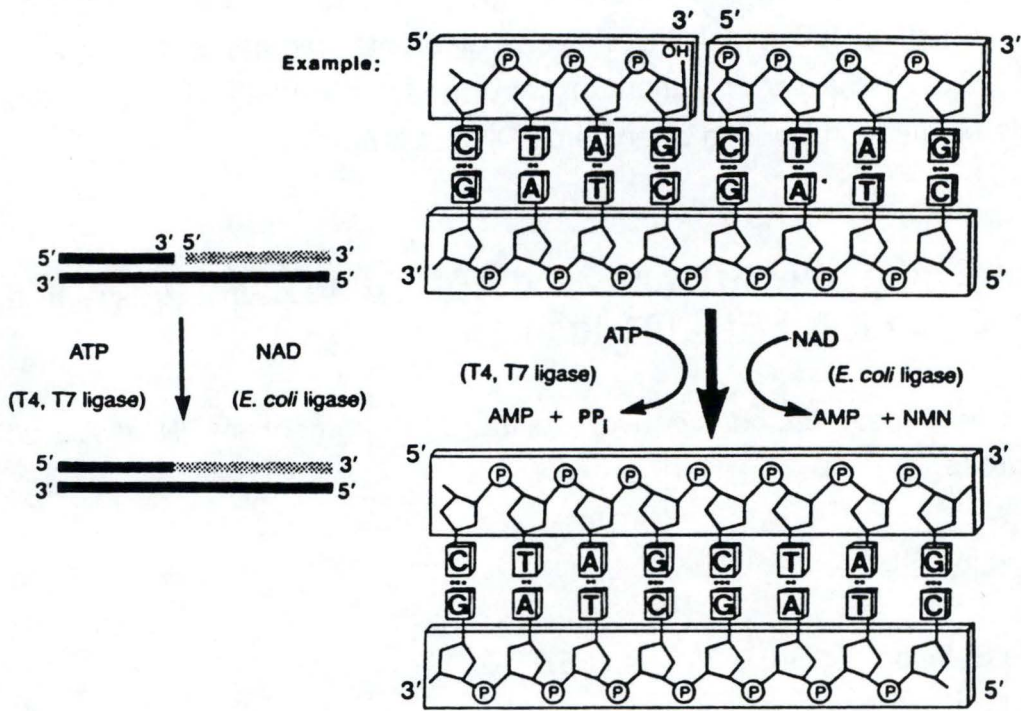


Figure 21 : Schéma d'une réaction de ligation.

- Eluer le fragment dans 20 μ l d' H_2O
- Incuber 2 à 3 minutes à 56 °C.
- Centrifuger 30 secondes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer le surnageant et refaire une élution à partir du culot.
- Centrifuger les 2 surnageants ainsi récupérés 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer le surnageant.
- Mettre sur gel d'agarose 1/5 du volume final pour vérification.

1.8. Ligation.

La ligation permet l'union de plusieurs morceaux d'ADN (en général entre un insert et un plasmide) restreint suite à une réaction enzymatique.

Elle est réalisée à partir de bouts droits ou protrudants. Dans ce dernier cas, il est nécessaire que les nucléotides de chaque extrémité soient complémentaires afin de pouvoir s'apparier. La DNA ligase (Boehringer, cfr. figure 21) du phage T4 catalyse la formation de liens phosphodiester entre le phosphate 5' d'une molécule d'ADN et une extrémité hydroxyl 3' d'une autre molécule. L'enzyme requiert de l'ATP ainsi que des cations Mg^{++} pour être activée.

Mélange de ligation :

1 unité de T4-DNA ligase	1 μ l
Tampon ligation 10 x concentré	1,5 μ l
ADN dilué dans l'eau	12,5 μ l

Laisser 14 heures à 14 °C.

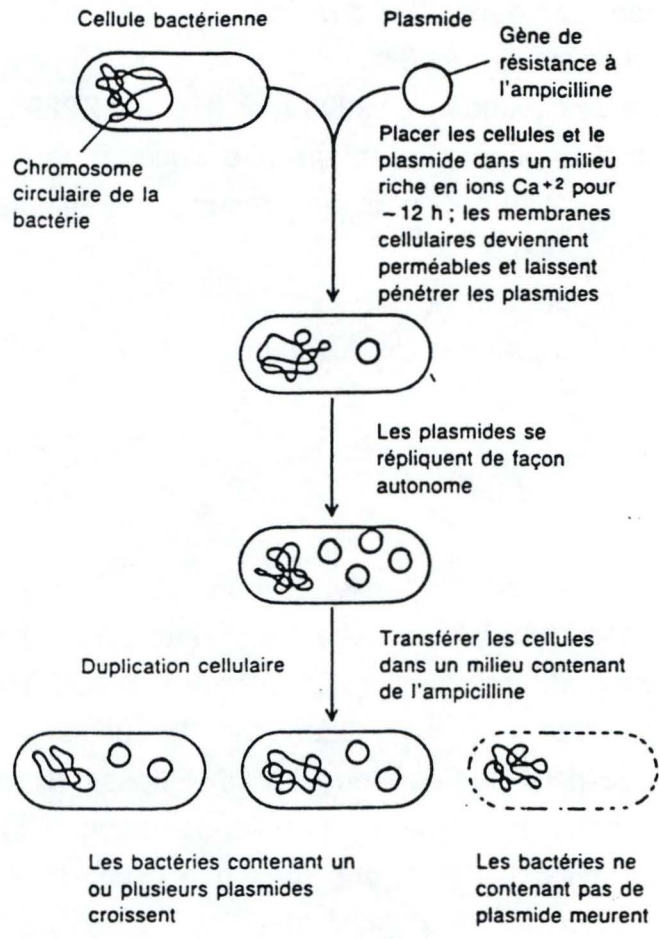


Figure 22 : Transformation bactérienne (Suzuki *et al.*, 1991).

1.9. Transformation bactérienne.

Après ligation, le nouveau plasmide est introduit dans une souche bactérienne (XL1 Blue dans notre cas) préalablement traitée afin de faciliter cette entrée (cfr. figure 22).

1.9.1. Cellules compétentes.

La paroi des bactéries receveuses (*E. Coli* XL1 blue) est rendue perméable à de l'ADN exogène suite aux passages des cellules dans une solution hypotonique de CaCl_2 .

CaCl_2	50 mM
CaCl_2	50 mM et glycérol 15 %

Méthode :

- Mettre les cellules 4 à 8 heures en culture (10 ml) dans milieu NZYM + tétracycline (100 $\mu\text{g/ml}$) jusqu'à obtenir une DO de 1,5 à 2 mesurée à 600 nm.
- Mettre ces 10 ml dans 100 ml de milieu contenant de la tétracycline et relancer une culture de 1 à 4 heures pour obtenir une DO (à 600 nm) de 0,3.
- Arrêter la culture en la mettant 10 minutes sur de la glace.
- Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm (Jouan CR 412).
- Eliminer le surnageant 2 fois.
- Resuspendre le culot dans 50 ml de CaCl_2 50 mM.
- Laisser 20 à 60 minutes sur glace.
- Centrifuger 5 minutes à 4000 rpm (Jouan CR 412).
- Eliminer le surnageant.
- Resuspendre dans 10 ml de CaCl_2 85 %/glycérol 15 %.
- Aliquoter dans des eppendorfs stériles.
- Stocker à -70°C .

1.9.2. Transformation.

Un choc thermique va permettre l'entrée de l'ADN au sein des cellules compétentes. Afin de régénérer la paroi, ces cellules sont ensuite maintenues 1 heure à 37 °C.

Méthode :

- Prendre 100 µl de cellules compétentes et les mettre dans un eppendorf.
- Ajouter le résultat d'une ligation.
- Incuber 1 heure sur glace.
- Mettre 2 minutes à 42 °C.
- Ajouter 1 ml de milieu NZYM sans ampicilline.
- Incuber une heure à 37 °C.
- Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Enlever 800 µl de milieu.
- Resuspendre dans les 200 µl restants.
- Etaler sur boîte de Pétri contenant un milieu sélectif.

Afin de s'assurer que tous les paramètres de la transformation sont optimaux, plusieurs contrôles sont nécessaires :

- contrôle négatif : on transforme sans ajouter de DNA.
- contrôle positif : on transforme en parallèle avec un plasmide dont on connaît la concentration. Ceci permet de contrôler le taux de transformation.
- contrôle de viabilité cellulaire : on dépose des cellules compétentes sur un milieu non sélectif.

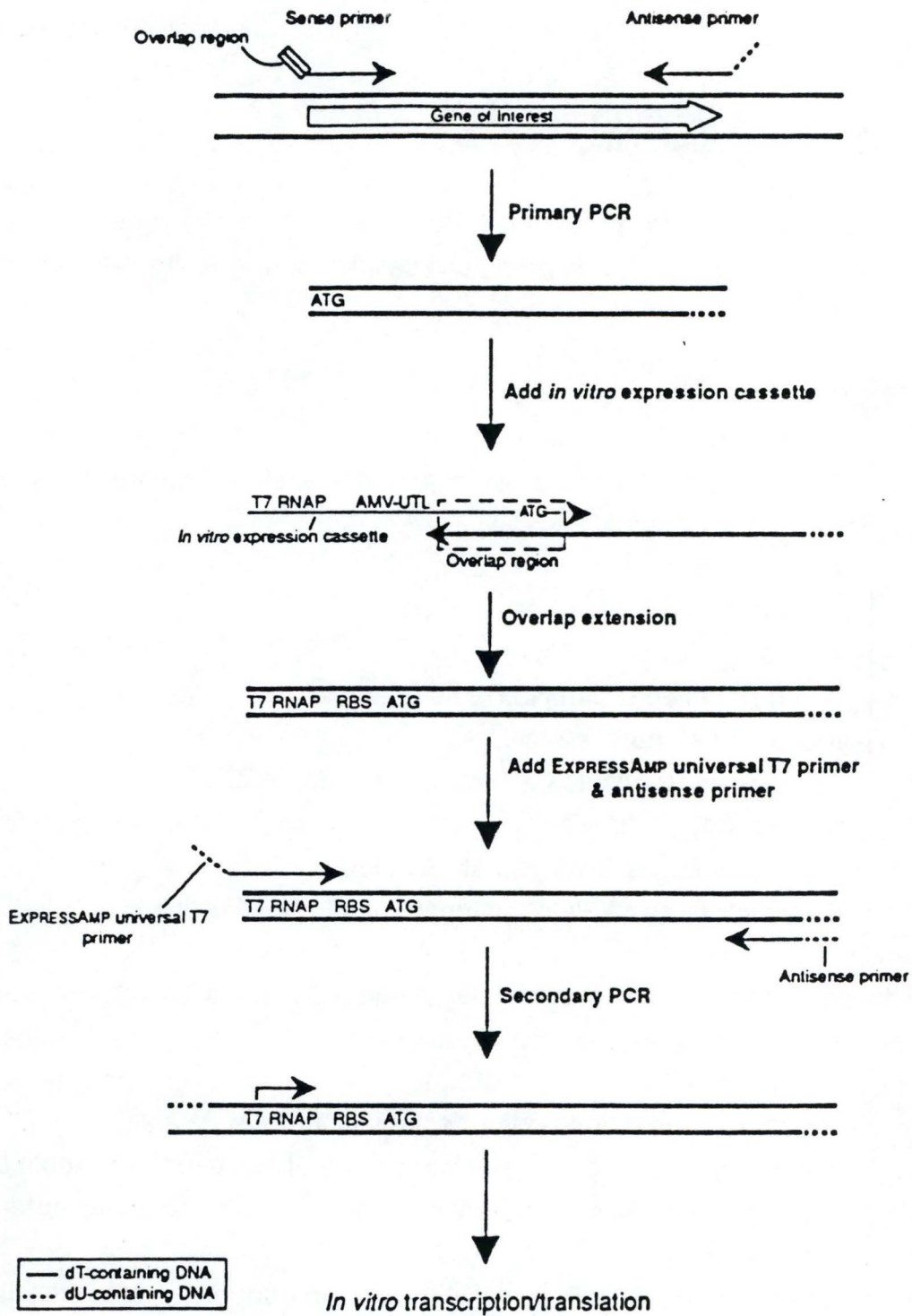


Figure 23 : Représentation de la technique EXpress Amp (Gibco BRL).

5'-CCAAGCTTC TAATACGACTCACTATA GG GTTTTTATTT TTAATTTTCT TTCAAATACT TCCATG-3'
 T7 RNAP AMV-UTL Met

Figure 24 : Séquence de la cassette d'expression *in vitro* WTT7 (Gibco BRL).

1.10. Induction par la température de l'expression du plasmide pJLA.

- Faire une préculture de bactéries transformées avec le plasmide pJLA dans 20 ml de MZYM-amp.
- Resuspendre 1ml de cette préculture dans 5 ml de milieu NZYM.
- Laisser de 3 à 4 heures à 42 °C.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Resuspendre dans un tampon adéquat (en fonction de l'utilisation de cette expression).

1.11. Utilisation de la technique PCR afin de produire une séquence d'ADN sous dépendance d'un promoteur T7 (cfr. figure 23).

Ce système, initialement destiné à l'expression *in vitro* dans un système acellulaire (lysats de réticulocytes de lapins), permet l'expression en cellules eucaryotes d'un gène particulier sous dépendance d'un promoteur T7 par l'intermédiaire de la technique PCR. Par ce système, on peut se libérer du clonage du gène cible.

Dans un premier temps le gène d'intérêt est sélectionné et amplifié par PCR en présence de 2 primers dont celui se positionnant du côté de l'ATG (forward), comporte une partie de sa séquence qui ne peut s'hybrider (partie 5' terminale). Le produit de cette amplification est purifié, puis une nouvelle fois amplifié en présence d'un primer WT7 (cfr. figure 24) s'hybridant sur la partie du premier primer non hybridée à la matrice. Le primer WT7 est un peptide de 67 bases comportant le site d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase T7 et une séquence 5' non traduite du virus de la mosaïque (Alfalfa) qui est un RBS (Ribosome binding site) permettant d'amplifier la traduction par un facteur 35.

Première amplification.

Mélange réactionnel (100 μ l total) :

Matrice	3 μ l
dNTP, 10 mM	2 μ l
Tampon (10 x concentré)	10 μ l
Chacun des 2 oligos (dont KW), 100 pmole	1 μ l
H ₂ O	80 μ l

Amplification proprement dite :

- 10 min à 95 °C.
- Ajouter 1 μ l de polymérase PCR.
- Réaliser 36 cycles :
 - 1 minute à 94 °C.
 - 1 minute à 50 °C.
 - 1 minute à 72 °C.
- Vérifier sur gel d'agarose (1/10 du volume)

Purification (Kit Wizard PCR Promega) :

- Retirer le glycérol.
- Ajouter le tampon de purification (volume-volume) et mélanger.
- Ajouter 1 ml de Wizard PCR preps (Promega).
- Vortexer plusieurs fois en une minute.
- Déposer le mélange dans la colonne et pousser avec une seringue (surmontant la colonne).
- Laver la colonne avec 2 ml d'isopropanol 80 %.
- Centrifuger 15 à 20 secondes.
- Eluer la colonne avec 50 μ l d'H₂O.
- Centrifuger 20 secondes.
- Récupérer le surnageant.
- Centrifuger 20 secondes et récupérer le surnageant.
- Mettre sur gel.

Deuxième amplification.

- 5 μ l de la première amplification.
- 10 μ l de tampon.
- 2 μ l du primer WT7 (15 fmoles par μ l).
- 2 μ l du primer antisense.
- 80 μ l d' H_2O .
- Glycérol.
- Mettre 5 minutes à 95 °C.
- Ajouter 1 μ l de l'enzyme.
- 4 cycles :
 - 1 minute à 95 °C.
 - 30 secondes à 25 °C.
 - 1 minute à 72 °C.
- 30 secondes à 80 °C.
- Ajouter 2 μ l de T7 primer et 2 μ l de l'oligo antisens (25 pmoles/ μ l).
- 34 cycles :
 - 1 minute à 95 °C.
 - 1 minute à 50 °C.
 - 1 minute à 72 °C.
- Mettre sur gel et purifier selon le même protocole que ce qui à été décrit ci-dessus.

2. Cultures cellulaires.

2.1. Cultures cellulaires.

2.1.1. Cellules.

Les cellules utilisées sont des CV1 (African Green monkey kidney fibroblast) de la collection européenne (ECACC n°87032605). Elles ont un caryotype $2n=60$. Elles sont souvent utilisées pour les transfections et sont suffisamment résistantes au double stress engendré par un système d'infection-transfection.

2.1.2. Milieu de culture (DMEM).

Pour un litre de milieu :

Dulbecco's MEM (Gibco BRL)	15,44 g
NaHCO ₃	0,044 M
Glutamine (200 mM) (Gibco BRL)	10 ml
Peniciline/streptomycine (Gibco BRL)	10 ml à pH 7,2

2.1.3. Maintien de la culture.

La culture se fait dans des boites NUNC de 75 cm², à 37 °C et en présence de 5 % de CO₂.

Lorsque les cellules sont confluentes :

- Retirer le surnageant de culture.
- Ajouter 5 ml de trypsine-EDTA (5 g/l) aux cellules.
- Recueillir les cellules ainsi détachées et les laver dans 20 ml de milieu DMEM.
- Centrifuger 10 minutes à 2000 rpm (Jouan CR 412).

- Retirer le surnageant.
- Resuspendre les cellules dans 5 ml de milieu contenant 10 % de F.C.S. (fetal calf serum Gibco BRL).
- Déposer 1 ml de ces cellules et 25 ml de milieu 10 % F.C.S. par boîte.

2.2. Cultures virales.

2.2.1. Virus.

A. Vaccine.

La vaccine T7 exprime le gène de la RNA polymérase du bactériophage T7 (5' → 3'). Ce gène est sous dépendance du promoteur P7,5 situé en amont des gènes EARLY et LATE de la vaccine (Moss, 1990). Cette caractéristique permet l'expression continue du gène de la T7 RNA polymérase dans les cellules infectées.

B. RSV.

La souche A2 du HRSV a été utilisé à des fins de contrôles.

2.2.2. Production de virus.

Pour une boîte de 75 cm² (NUNC) :

- Retirer le milieu des cellules subconfluentes.
- Ajouter 4 ml de milieu DMEM et contenant une quantité adéquate de virus (de 0,1 à 1 TCID₅₀ par cellule). Le TCID₅₀ est la quantité de virus procurant 50 % des puits infectés.
- Laisser 2 heures à 37 °C.
- Retirer le milieu contenant le virus.
- Laver avec 2 ml de milieu sans sérum.
- Ajouter 25 ml de milieu contenant 2,5 % de FCS.

- Lorsque la lyse cellulaire est suffisante, arrêter l'infection par 3 cycles de gel-dégel.
- Récupérer le surnageant.
- Aliquoter et conserver à - 70 °C.
- Mesurer le titre viral.

2.2.3. Titre viral (TCID 50).

Pour une boîte de 96 puits de cellules subconfluentes CV1 :

- Faire 8 dilutions de 10 en 10 du virus dans du milieu sans FCS.
- Retirer le milieu des cellules et infecter chaque ligne avec la dilution appropriée.
- Laisser 2 heures à 37 °C.
- Retirer le milieu et remplir chaque puits avec 100 µl de milieu 2,5 %.
- Laisser 2 jours à 37 °C.
- Compter le nombre de puits contenant au moins une plage de lyse par dilution.
- Le titre viral viral exprimé en TCID₅₀ correspond à
 $\log_{10}(\text{TCID}_{50}) = I + d(S - 0,5)$ où :

I = log₁₀ de la première dilution (concentration la plus forte)

d = log₁₀ du facteur de dilution.

S = la somme des pourcentages des puits de cellules infectées à chaque dilution.

0,5 = un facteur constant à retrancher.

2.3. Transfection simple.

Le but de la transfection simple est de favoriser l'entrée dans la cellule eucaryote d'ADN étranger afin d'y permettre l'expression de gène-cible. Celui-ci est situé en aval d'un promoteur (SV40, par exemple) pouvant être exprimé en cellules eucaryotes. Plusieurs systèmes de transfactions ont été

testés. Les transfections sont réalisées dans des puits de 30 mm de diamètre sur des cellules CV1 à 60 à 80 % de confluence.

2.3.1. Technique de précipitation au CaPO₄.

A. Solutions utilisées :

- H(BS)₂ :

NaCl 0,14 M

KCl 5 mM

Na₂HPO₄ 1 mM

Sucrose 0,1 %

Hepes 20 mM

Porter le pH à 7,05 à l'aide de NaOH 0,5 M et filtrer (0,22 µm).

- CaCl₂ 2,5M filtré, stérilisé et stocké à -20 °C.

B. Méthode :

- Diluer 5 µg de DNA dans 1 ml d'H(BS)₂.
- Ajouter 50 µl de CaCl₂ goutte à goutte en vortexant.
- Laisser 30 minutes à 20 °C.
- Déposer la solution sur les cellules préalablement lavées 3x avec du milieu.
- Ajouter 3 ml de milieu.
- Laisser 3 h 30 à 37 °C.
- Retirer le milieu.
- Ajouter 3 ml de milieu contenant 5 % (FCS).
- Laisser 24 heures à 37 °C.

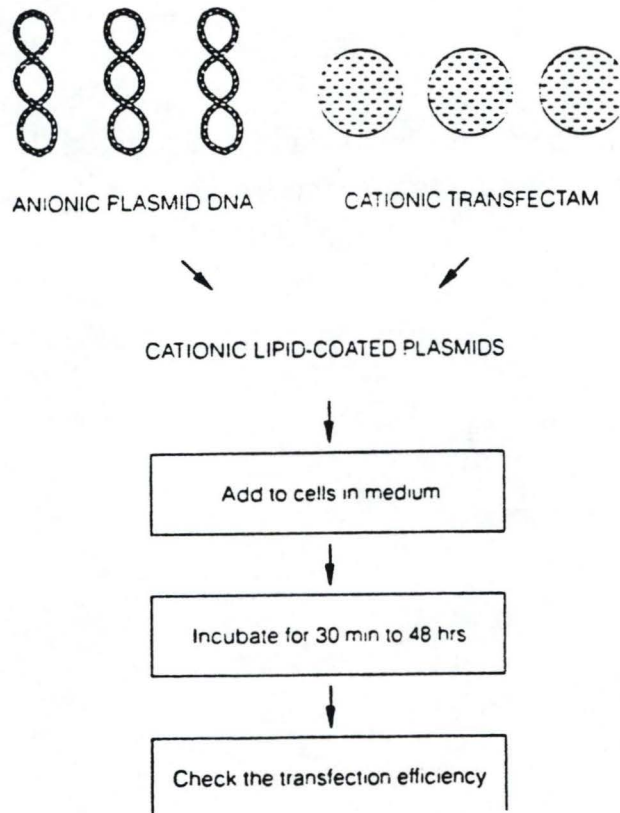


Figure 25 : Représentation schématique de la technique de transfection avec le lipide cationique Transfectam (Promega).

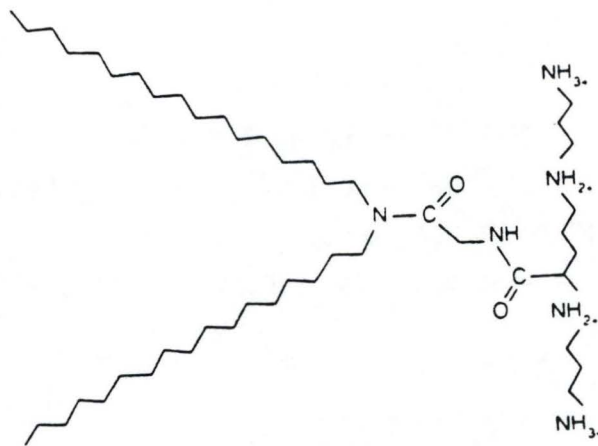


Figure 26 : Molécule de Transfectam (Promega).

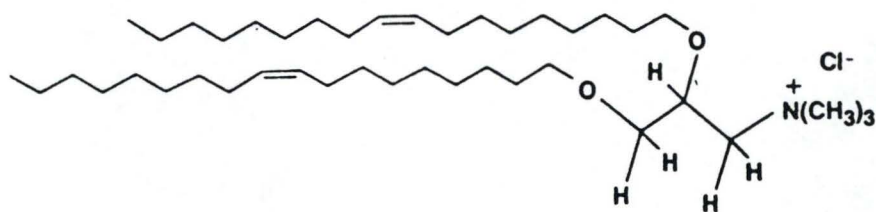


Figure 27 : Molécule de DOTMA.

2.3.2. Lipides cationiques.

Cette technique de transfection se base sur l'interaction entre l'ADN plasmidique et ce lipide cationique ainsi qu'entre le lipide et la membrane cellulaire.

A. Transfectam (Promega) (cfr figure 25).

C'est une lipopolyamine synthétique dont la formule chimique est $C_{47}H_{99}O_2N_6$ et dont la masse moléculaire est de 779 daltons (cfr. figure 26).

Par puits de 30 mm de diamètre (NUNC) :

- Ajouter 1 à 5 μ g de DNA dans 300 μ l de milieu.
- Vortexer.
- Ajouter, par μ g de DNA, de 1,5 à 3 μ l du réactif dans 300 μ l de milieu sans sérum.
- Vortexer.
- Mélanger les deux solutions et ajouter 400 μ l de milieu.
- Déposer sur les cellules préalablement lavées 3 x avec du milieu.
- Laisser de 6 à 24 heures totales à 37 °C.

B. Lipofectine (Gibco BRL).

Ce lipide cationique est composé de DOTMA (N-[1-(2,3-dioléyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammoniumchloride) (cfr. figure 27) et du lipide neutre DOPE (dioléoyl phosphatidyléthanolamine) à un taux de 1 pour 1 dilué dans de l'eau à une concentration totale de lipide de 1 mg par ml (voir schéma ci-contre). On présume que la formation du complexe est due à l'interaction entre les groupements chargés positivement de la molécule DOTMA et les charges des groupes phosphates de l'ADN (cfr. figure 28).

**DNA-lipid complexes
(must be serum-free)**

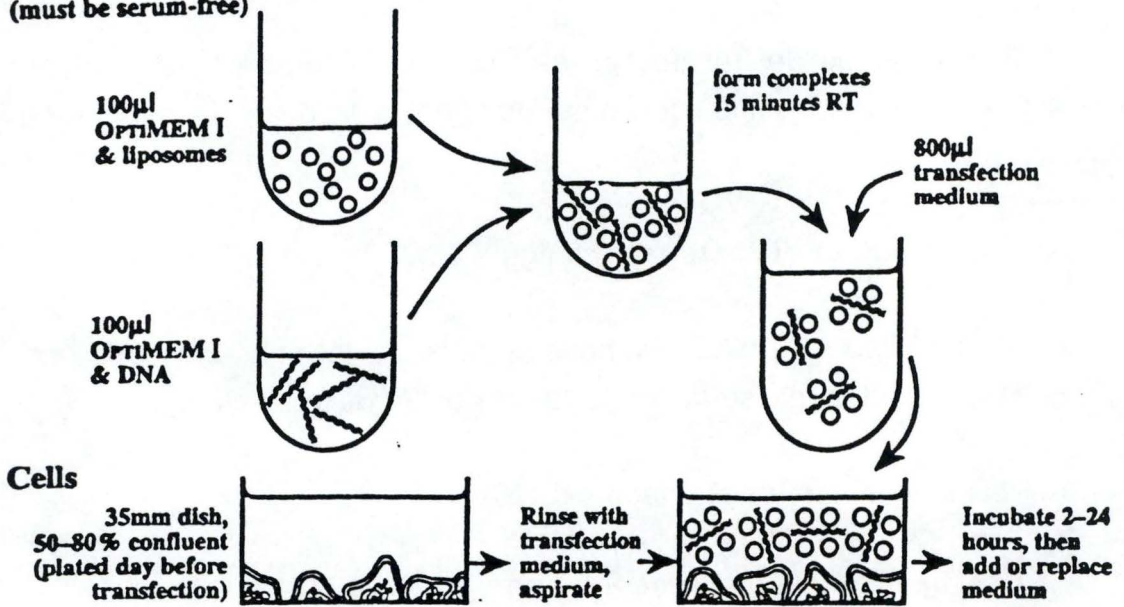


Figure 28 : Représentation schématique de la technique de transfection en présence de lipofectine ou de lipofectamine (Gibco BRL).

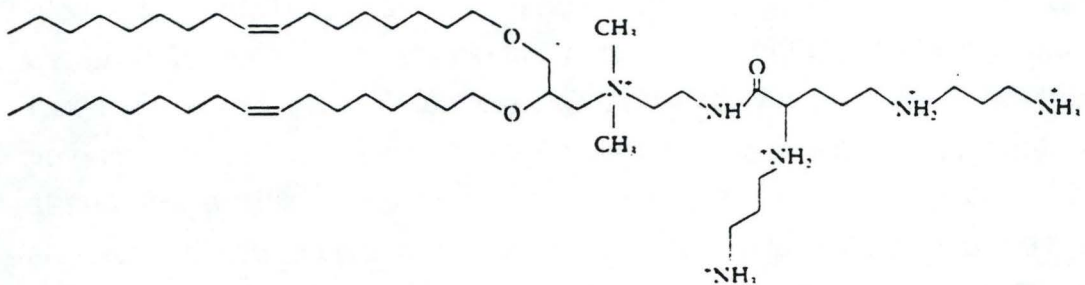


Figure 29 : Molécule de DOPSA

Par puits de 30 mm de diamètre (NUNC) :

- Ajouter de 2 à 20 μ l de Lipofectine dans 100 μ l d'OPTIMEM 1 (Gibco BRL).
- Ajouter de 1 à 2 μ g de DNA dans 100 μ l d'OPTIMEM 1.
- Mélanger ces deux solutions et laisser incuber 15 minutes.
- Ajouter 800 μ l d'OPTIMEM 1.
- Déposer sur les cellules préalablement lavées 3 x avec du milieu.
- Laisser incuber de 4 à 6 heures à 37 °C.
- Retirer la solution.
- Mettre 3 ml de milieu avec 2,5 % de F.C.S.
- Laisser 18 heures à 37 °C.

C. Lipofectamine (Gibco BRL) .

Lipide polycationique composé de DOPSA (2,3-dioléoxy-N-[2(sperminocarboxamida)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium-trifluoroacétate) (cfr. figure 29) et de DOPE à un taux de 3 pour 1 dilué dans de l'eau à une concentration totale de lipide de 2 mg/ml (voir schéma ci-contre).

Le protocole d'utilisation et le mode d'action présumé de la transfection sont les même que pour la Lipofectine (cfr. figure 28).

2.4. Infection-Transfection.

Cette technique est utilisée afin d'exprimer les gènes sous dépendance d'un promoteur T7 (plasmide pOS7 ou express Amp). L'ARN polymérase-ARN dépendante T7 est exprimée par la Vaccine.

Par puits de 30 mm (NUNC) :

- Laver 1 x les cellules subconfluentes avec du milieu.
- Inoculer avec du virus Vaccine de 0,5 à 1 TCID₅₀ par cellule.
- Laisser de 30 minutes à 1h 30 à 37 °C.
- Laver 2 x avec du milieu.

- Transfecter comme décrit précédemment avec 3 μg de DNA et 5 à 7 μl de lipofectine ou lipofectamine.
- Laisser 4 heures à 37 °C.
- Retirer le milieu.
- Mettre 3 ml de milieu 2,5 % (FCS).
- Laisser 18 heures à 37 °C.

2.5. Détection du produit de l'expression des DNA transfectés.

2.5.1. Détection immunochimique sur cellules fixées.

A. Fixation des cellules.

- Retirer le milieu.
- Déposer 1 ml par puits d'acétone glacial 90 %.
- Laisser 1 minute sur carboglace.
- Retirer.
- Laisser sécher 24 heures.
- Conserver à -20 °C.

B. Révélation par immunofluorescence.

Solutions utilisées :

- PBS (Phosphate buffer saline) :

KH ₂ PO ₄	0,009 M
Na ₂ HPO ₄	0,81 M
NaCl	13,7 M
KCl	0,27 M

- Hydrolysate de caséine (HC) :

- Diluer 25 g de caséine de lait bovin (Fluka) dans 800 ml de NaOH 0,3 N.
- Mettre sous agitation une nuit à 37°C.
- Ajuster le pH à 7 avec de l'HCl concentré.
- Porter le volume à un litre.
- Filtrer.

Méthode :

- Laver au PBS les cellules fixées.
- Saturer 30 minutes avec du PBS-HC 50/50.
- Ajouter 1 ml par puits d'anticorps AK13A2 dilué dans du PBS-HC 50/50.
- Laisser 1 heure à température ambiante.
- Laver 3 x au PBS-Tween 0,01 %.
- Ajouter 1 ml par puits d'anticorps de polysérum de mouton anti-souris liés au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) dilué dans du PBS Tween-HC 50/50.
- Laisser 1 heure à température ambiante.
- Laver 3 x au PBS-Tween.
- Fixer avec 1 ml de paraformaldéhyde 4 %.
- Mettre 10 minutes à 4 °C.
- Laver 1 x au PBS.
- Ajouter 500 µl de Glycérine-PBS (9/1) pH 9-9,5.
- Observer au Microscope à fluorescence.

C. Marquage des noyaux au Giemsa.

Solution utilisée :

- Giemsa (Merck) 10 % dilué dans de l'eau.
- PBS-NaN₃ 0,1 %.

Méthode :

- Déposer 1 ml de Giemsa par puits de cellules fixées.
- Laisser 15 minutes à température ambiante.
- Laver 3 x à l'eau distillée.
- Ajouter 1 ml de PBS-NaN₃.

2.5.2. Détection sur lysat cellulaire.

A. Lyses cellulaires.

Tampon Lyse :

Reporter lysis 5 x buffer (Promega) dilué dans de l'eau distillée.

- Retirer le milieu.
- Laver 3 fois avec 1 ml de PBS par puits.
- Ajouter 300 µl de Reporter lysis 1 x.
- Incuber 15 minutes à température ambiante.
- Détacher les cellules
- Récupérer le surnageant dans un eppendorf à 4 °C.
- Vortexer 10 à 15 secondes.
- Centrifuger 2 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer le surnageant.
- Stocker à -70 °C.

Gel-Dégel :

- Retirer le milieu.
- Laver 3 fois au PBS 1 x.
- Ajouter 1 ml de PBS 1 x.
- Récupérer les cellules dans des eppendorfs.
- Faire 3 cycles gel-dégel.
- Centrifuger 5 minutes à 12000 rpm (Hermle Z229).
- Récupérer le surnageant.
- Stocker à -70 °C.

Le protocole pour les trois détergents suivants est le même que pour le tampon de lyse :

- NP 40 : Nonidet P 40 (Fluka) 1 % dilué dans du PBS 1 x.
- Tampon RIPA : Radio ImmunoPrecipitation Assay.
- Octylt (1-O-Octyl- β -D-glucopyranosid , Sigma) dilué dans du PBS 1/1000.

B. Dosage enzymatique de la β Galactosidase (kit Promega).

Solutions utilisées.

- Tampon Lyse.
- Tampon de révélation

Na ₂ HPO ₄	120 mM
NaH ₂ PO ₄	80 mM
MgCl ₂	2 mM
β -mercaptoéthanol	100 mM
ONPG (Sigma)	4,406 mM
Na ₂ CO ₃	1 M

- β -Galactosidase 1,060 unités/ml utilisé à des fins d'étalonnage.

Méthode pour chaque échantillon :

- Prendre 100 μ l de l'échantillon.
- Ajouter 50 μ l du tampon de lyse et 150 μ l de tampon de révélation
- Vortexer.
- Mettre 30 minutes à 37 °C.
- Arrêter la réaction avec 500 μ l de Na₂CO₃.
- Vortexer.
- Lire à 405 nm.

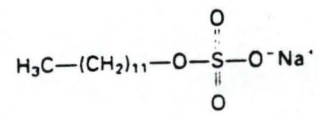


Figure 30 : Structure du dodécylsulfate de sodium (SDS).

C. Dot blot.

Solutions utilisées :

- Tampon Laemmli :

Tris-HCl	6 mM
SDS (sodium dodécyl disulfate, cfr. figure 30)	2 %

- Tampon de révélation :

Tris-HCl	0,02 M
MgCl ₂	0,4 M
pH 9,5	

- Solution de révélation :

Nitro Blue Tetrazolium	0,0012 mM
Tampon de révélation	10 ml
BCIP (50 mg par ml de dimethyl-formamide) à 12 µl/10 ml de tampon de révélation.	

- Membrane de nitrocellulose (Millipore) : 45 µm.

Méthode :

- Découper la nitrocellulose aux dimensions du "vacuum blotter" (Bio-Rad).
- Humidifier la membrane avec du PBS.
- Placer la membrane dans l'appareil et s'assurer de l'absence de fuite d'air.
- Ajouter à 100 µl d'échantillon, 50 µl de tampon Laemmli.
- Porter les échantillons 5 minutes à 100 °C.
- Déposer la dilution appropriée dans chaque dot.
- Aspirer jusqu'à ce que tout le liquide soit passé à travers le filtre.
- Retirer le filtre du "vaccum".

- Saturer avec d'HC-PBS 50/50.
- Laisser 1 heure sous agitation.
- Laver 3 x pendant 10 minutes avec du PBS-Tween.
- Ajouter l'anticorps dilué avec de l'HC-PBS 50/50.
- Laisser 1 heure sous agitation.
- Laver 3 x pendant 10 minutes avec du PBS-Tween.
- Mettre de l'anti-anticorps de souris lié à la phosphatase alcaline dilué avec de l'HC-PBS.
- Laisser 1 heure sous agitation.
- Laver 3 x pendant 10 minutes avec du PBS-Tween.
- Ajouter la solution de révélation.
- Révéler à l'abri de la lumière sous agitation.
- Laver à l'eau courante.

D. Western blot. (Towbin *et al.*, 1979; cfr. figure 31).

Solutions utilisées.

- Running gel (12 %) :

4 ml d'acrylamide 30 % (BIO-RAD, cfr. figure 32).

2,5 ml de lower buffer:

Tris-HCl 1,5 M

SDS 4 %

pH 8,8

3 ml d'H₂O.

0,5 ml de peroxodisulfate d'ammonium (APS) 1 %.

10 µl de Temed (N,N,N',N' -tetra methylethylenediamine).

- Stacking gel (3 %) :

1 ml d'acrylamide 30 %.

2,5 ml d'Upper buffer :

Tris-HCl 0,5M

SDS 4 %

pH 6,8

5,5 ml d' H₂O.

1 ml d'APS.

10 µl de Temed.

- Tampon "5 x concentré" :

Tris-HCl	250 mM
SDS	10 %
Glycérol	50 %
β-2 mercaptoéthanol	10 %
Bleu de bromophénol	0,25 %

- Tampon électrophorèse :

Tris-HCl	0,025 M
Glycine	0,192 M
SDS	0,1 %
pH 8,3	

- Tampon blotting :

Tris- HCl	0,025 M
Glycine	0,192 M
Méthanol	20 %

Méthode :

- Monter les plaques d'électrophorèse.
- Couler le running gel jusqu'à 1 cm du peigne.
- Déposer de l'alcool isobutylique sur le gel afin d'empêcher l'oxygène de diffuser dans le gel et d'inhiber la polymérisation.
- Lorsque le gel est polymérisé, retirer l'alcool et nettoyer avec de l'eau afin d'éliminer la phase liquide.
- Couler le stacking gel.
- Déposer le peigne.
- Préparation des échantillons : ajouter 5 µl de tampon "5 x concentré" à 20 µl d'échantillon.
- Mettre 10 minutes à 100 °C.
- Dès que la polymérisation a eu lieu, retirer le peigne et recouvrir le gel de tampon électrophorèse.

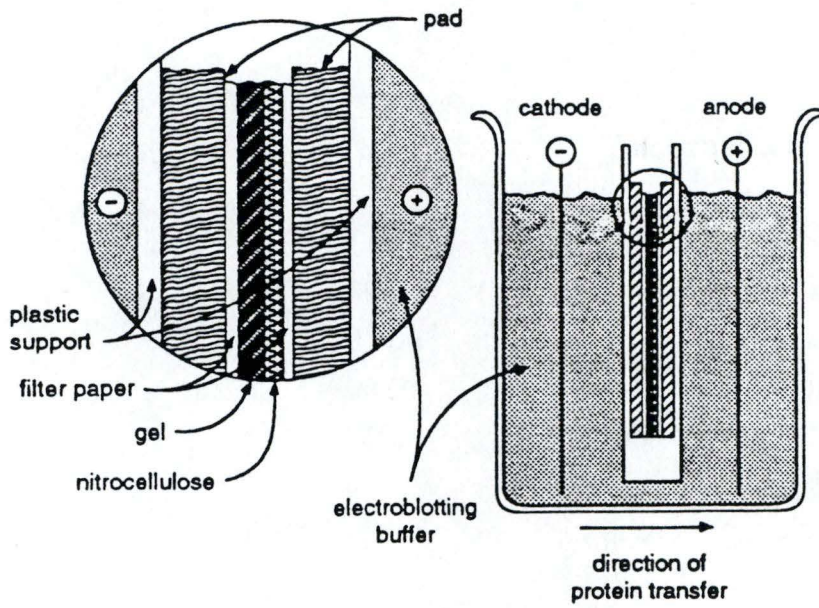


Figure 33 : Principe du transfert de protéines sur nitrocellulose.

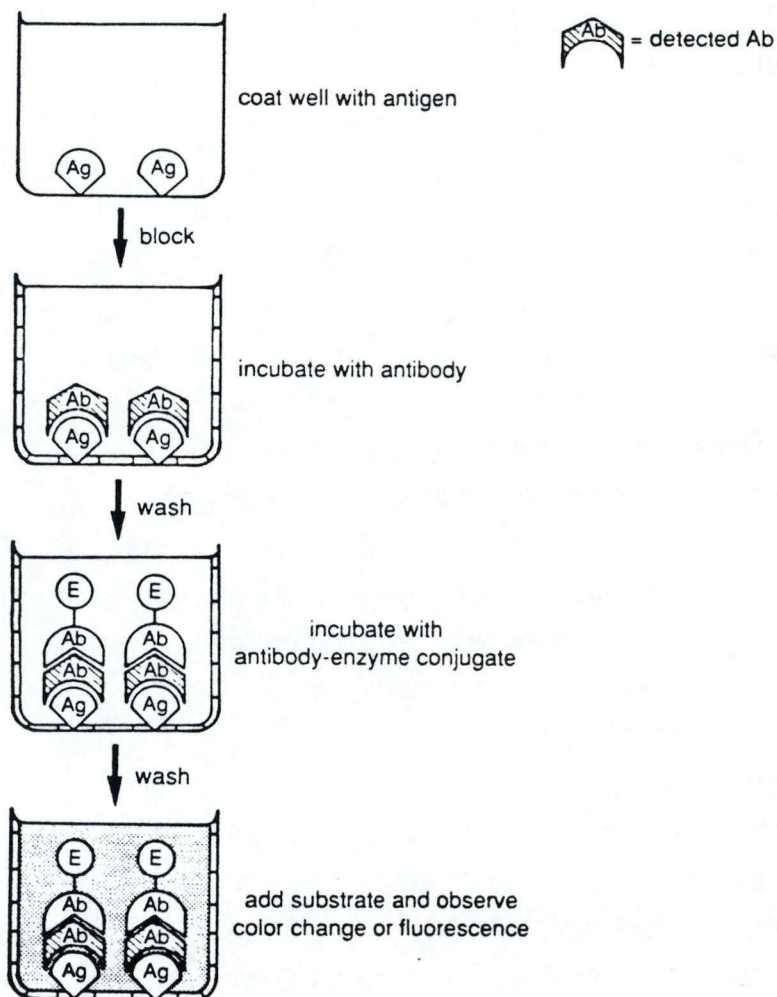


Figure 34 : Principe de l'ELISA de capture.

- Déposer 20 μ l de chaque échantillon dans les puits.
- Laisser migrer 20 minutes à 200 volts.
- Transférer sur membrane de nitrocellulose (cfr. figure 33) :
 - Côté anode (borne +).
 - Déposer par ordre le papier Whatman, la nitrocellulose et le gel et du papier Whatman.
 - Mettre ce "sandwich" dans la cuve remplie de tampon blotting.
 - Laisser migrer 2 heures à 50 Volts.
- La révélation suit le protocole décrit pour la révélation en dot-blot.

E . ELISA indirect (cfr. figure 34).

Solutions utilisées :

- Tampon citrate-phosphate :

Na ₂ HPO ₄	0,1 M
Acide citrique	0,05 M
Porter le pH à 5	

- Solution de révélation à la peroxydase :

OPD (o-phényl-diamine) (4 mg/ml)	1 ml
Tampon citrate-phosphate à pH 5	9 ml
H ₂ O ₂	1,8 μ l

Méthode :

- Déposer 50 μ l de la dilution appropriée dans chaque puits plaque ELISA maxisorp (NUNC).
- Incuber à 4 °C toute la nuit.
- Saturer avec 100 μ l de l'HC-PBS.
- Laisser 1 heure à température ambiante.
- Laver 5 x avec du PBS-Tween.
- Déposer 100 μ l d'Ac dilué dans de l'HC-PBS.
- Laisser 1 heure à température ambiante.

- Laver 10 x avec du PBS-Tween.
- Déposer 100 μ l d' Ac anti-souris lié à la peroxydase dilué dans de l'HC-PBS.
- Laisser 1 heure à température ambiante.
- Laver 10 x avec du PBS-Tween.
- Déposer 100 μ l par puits de la solution de révélation.
- Laisser 10 minutes à l'abri de la lumière.
- Arrêter la réaction en déposant 100 μ l par puits d' H_2SO_4 2N.
- Lire la DO à 490 et 630 nm.

2.6. Immunisation.

Les souris BALB/c de 6 semaines ont été immunisées intradermiquement avec la solution d'antigène auquel a été ajouté un volume égal d'adjuvant Quil A (0,3 mg/ml). Deux rappels distants de 15 jours ont été réalisés.

Des prélèvements sanguins rétro-orbitaux sont effectués tous les 15 jours après la deuxième immunisation. Le sang récolté, coagulé pendant une nuit à 4 °C, a été centrifugé 15 minutes à 2700 rpm (Jouan CR 412). Les séra recueillis sont finalement analysés par ELISA indirect.

Résultats

1. Optimisation des conditions de transfections des cellules CV1.

1.1. Introduction.

Ce travail consiste à mettre au point l'expression transitoire en cellules eucaryotes par un système d'infection-transfection. Il convient donc dans un premier temps d'optimiser le système de transfection en cellules eucaryotes tout en gardant à l'esprit que ces dernières subiront deux chocs successifs (infection par la Vaccine suivie d'une transfection).

Le choix des cellules utilisées s'est porté sur les cellules CV1 (fibroblastes de singe vert d'Afrique) qui, outre le fait d'être utilisées régulièrement avec succès en transfection, sont suffisamment résistantes pour permettre l'infection à l'aide du virus de la Vaccine. De plus, l'utilisation de ces cellules dans ce système d'expression transitoire a été décrite dans la littérature (Sommerfelt *et al.*, 1992; Mizukami *et al.*, 1988).

Parmi les différentes méthodes de transfections, nous avons sélectionné et comparé la précipitation au phosphate de calcium et les lipides cationiques. Parmi ces derniers, on trouve le Transfectam (Promega) pour lequel nous ne possédons aucune données quant à l'efficacité de transfection sur ces cellules CV1 ainsi que la lipofectine et lipofectamine (Gibco BRL) performant pour l'incorporation d'ADN dans les cellules CV1 (Ciccarone *et al.*, 1993; Hawley-Nelson *et al.*, 1993).

L'efficacité de la transfection est déterminée par l'expression d'un gène "reporter" (inséré dans un plasmide s'exprimant dans les cellules eucaryotes). Dans notre cas, il s'agira de la β -galactosidase dont le gène lac Z est sous dépendance d'un promoteur fort spécifique de gènes viraux :

- promoteur SV40 (Simian virus) pour le plasmide pSV β
- promoteur CMV (cytomégalovirus) pour le plasmide pCMV β .

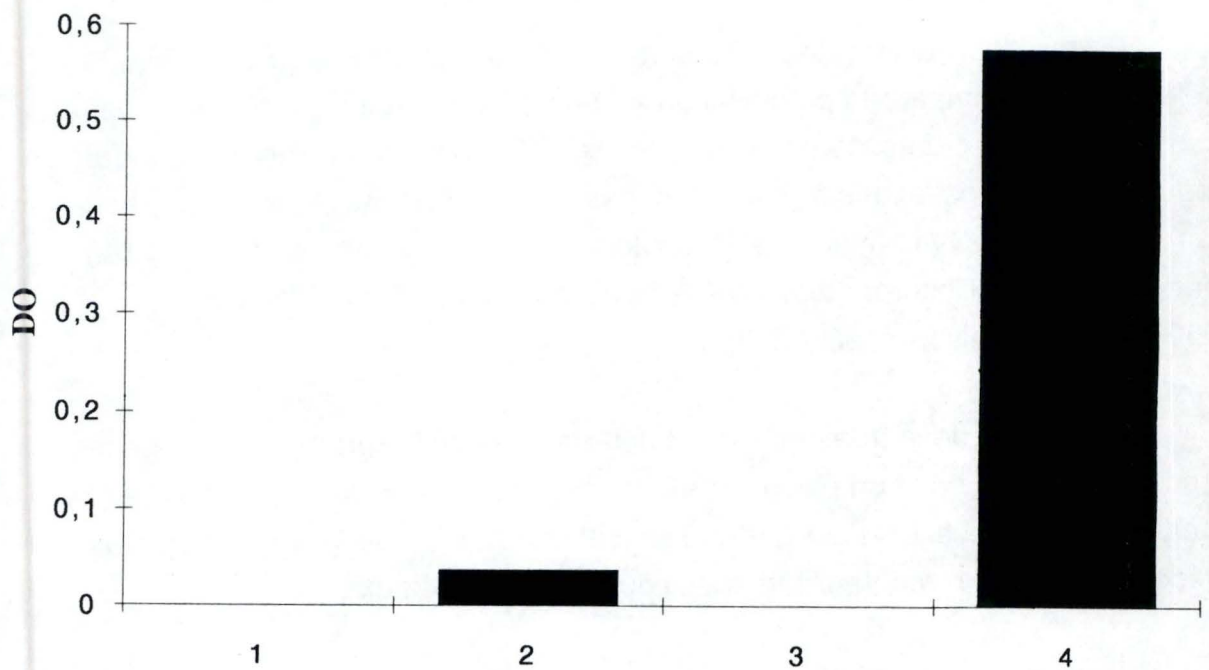


Figure 35 : Comparaison des différentes techniques de transfection.
La quantité d'ADN utilisée est de 3 μ g (plasmide pSV β).

Colonne 1 : témoin CaHPO₄.

Colonne 2 : transfection au moyen de CaHPO₄ pendant 6 heures.

Colonne 3 : transfection au moyen de CaHPO₄ pendant 24 heures.

Colonne 4 : transfection au moyen de lipofectine (5 μ l) pendant 24 heures.

Le dosage enzymatique de la β -galactosidase a été réalisé en présence d'ONPG sur lysat cellulaire (le tampon de lyse est fourni dans le Kit de révélation Promega utilisé).

Précisons enfin que les transfections ont été réalisées dans des puits de 30 mm de diamètre sur cellules CV1 à 60-80% de confluence. Le nombre de cellules par puits est estimé à 500 000.

1.2. Comparaison des différentes solutions permettant la transfection des cellules CV1.

Pour comparer les différentes solutions de transfections entre elles, et cela dans les meilleures conditions possibles, nous nous sommes dans un premier temps limité à l'utilisation du plasmide pSV β .

La période moyenne de transfection a été choisie en tenant compte de la littérature (mais aussi des recommandations des fabricants de lipides cationiques). La durée maximale de transfection nous intéressant pour la suite de ce travail a été limitée à 24 heures.

Les conditions adoptées lors de cette comparaison sont :

- Une durée de transfection par précipitation au phosphate de calcium comprise entre 6 et 24 heures
- Une durée comprise entre 6 et 24 heures pour le lipide Transfectam.
- Une durée minimum de 24 heures pour la lipofectine (et lipofectamine).
- Une quantité d'ADN égale à 3 μ g.

Dans une première expérience (cfr. figure 35), nous avons comparé la technique de précipitation au phosphate de calcium et la lipofectine. Lors de la transfection à l'aide de lipofectine, 5 μ l de lipides ont été testés pendant 24 heures.

On observe une production de β -galactosidase pour 6 heures de transfection par précipitation et pour la lipofectine (cfr. colonnes 2 et 4 de la figure 35). Toutefois, alors que la production obtenue en lipofectine est très acceptable

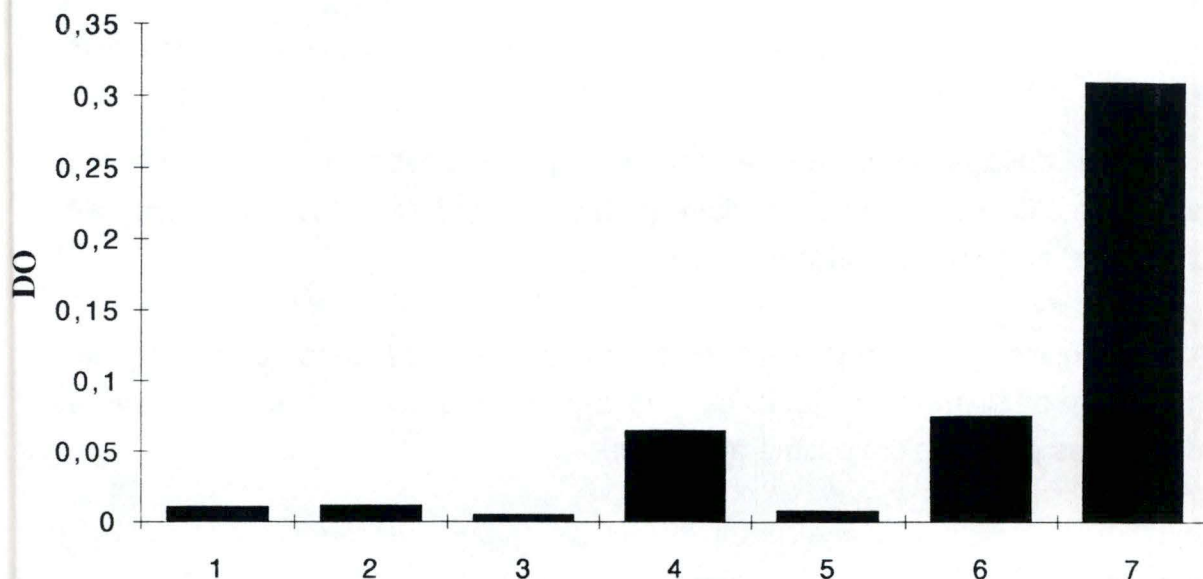


Figure 36 : Comparaison des différentes techniques de transfections.
La quantité d'ADN utilisée est de 3 μg (plasmide pSVB).

Colonne 1 : témoin lipofectine.

Colonne 2 : témoin DNA.

Colonne 3 : 5 μl de transfectam pendant 6 heures.

Colonne 4 : 5 μl de transfectam pendant 24 heures.

Colonne 5 : 10 μl de transfectam pendant 6 heures.

Colonne 6 : 10 μl de transfectam pendant 24 heures.

Colonne 7 : 5 μl de transfectam pendant 24 heures.

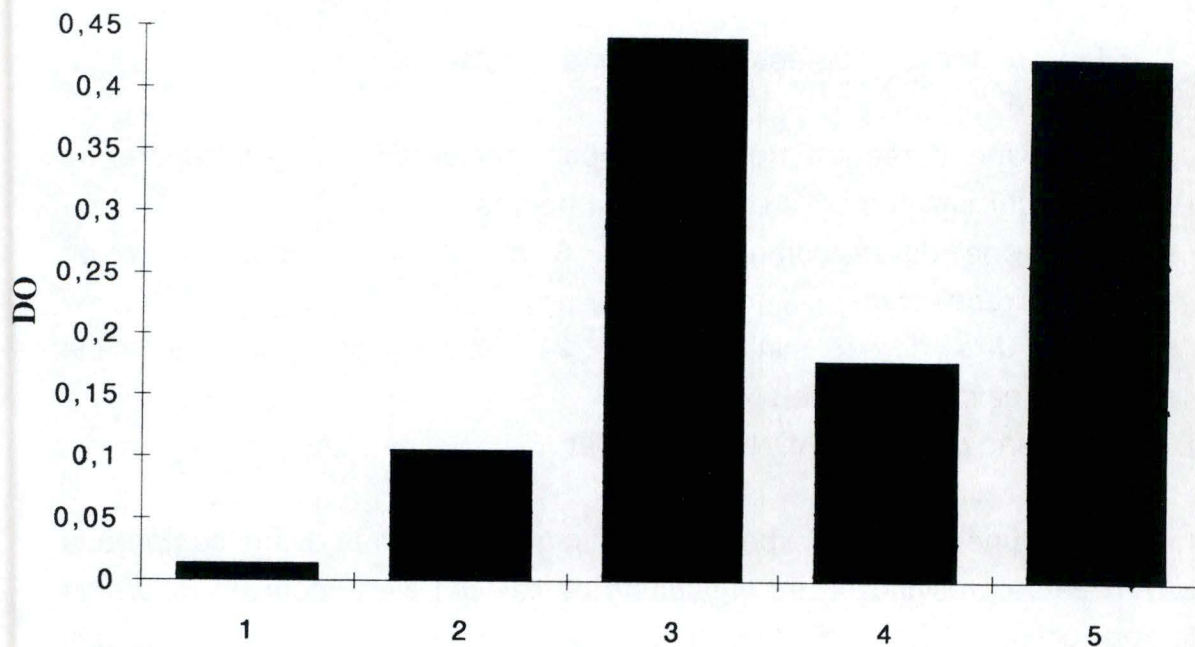


Figure 37 : Détermination de la quantité d'ADN optimale pour le plasmide pSVB en présence de quantités variables de lipofectine.

Colonne 1 : témoin cellulaire.

Colonne 2 : 2 μg de DNA et 5 μl de lipide.

Colonne 3 : 3 μg de DNA et 5 μl de lipide.

Colonne 4 : 2 μg de DNA et 7 μl de lipide.

Colonne 5 : 3 μg de DNA et 7 μl de lipide.

(cfr. colonne 4 de la figure 35), la technique de transfection au phosphate de calcium n'offre qu'une très faible production de β -gal, et ce quelle que soit la durée de transfection.

Lors d'une deuxième expérience, le transfectam et la lipofectine ont été comparés. Les quantités de transfectam testés pour 6 et 24 heures de transfection sont de 5 et 10 μ l. La lipofectine est toujours utilisée à raison de 5 μ l pendant 24 heures.

La figure 36 montre une production de β -gal dans tous les cas. Cependant une meilleure production est observée après 24 heures (cfr. colonnes 4 et 6 de la figure 36). Enfin, les résultats en lipofectine sont toujours supérieurs à ceux obtenus en présence de transfectam (cfr. colonne 7 de la figure 36).

Au cours des prochaines expériences, et au vu de ces résultats, la lipofectine sera préférentiellement utilisée. En effet, l'efficacité de la production de β -galactosidase suite à l'utilisation de lipofectine apparaît supérieure aux deux autres techniques. En ce qui concerne la précipitation au phosphate de calcium, la mortalité importante des cellules observées après 24 heures semble indiquer une toxicité importante du produit utilisé et ainsi expliquer ces faibles résultats.

1.3. Optimisation des conditions de transfection des cellules CV1 à l'aide de lipides cationiques .

1.3.1. Détermination de la quantité d'ADN optimale.

Jusqu'à présent, ce travail s'est limité à l'utilisation du vecteur plasmidique pSV β , et ce pour une quantité de 3 μ g d'ADN en présence de 5 μ l de lipofectine. Au cours de ces deux nouvelles expériences, la quantité de lipofectine et d'ADN nécessaires à une production optimale de la protéine "reporter" ont été déterminées.

La figure 37 représente la production de β -galactosidase obtenue pour 2 et 3 μ g d'ADN de pSV β , ainsi que 5 et 7 μ l de lipofectine. Une production plus importante est observée pour 3 μ g d'ADN, quelque soit la quantité de lipofectine (cfr. colonnes 3 et 5 de la figure 37).

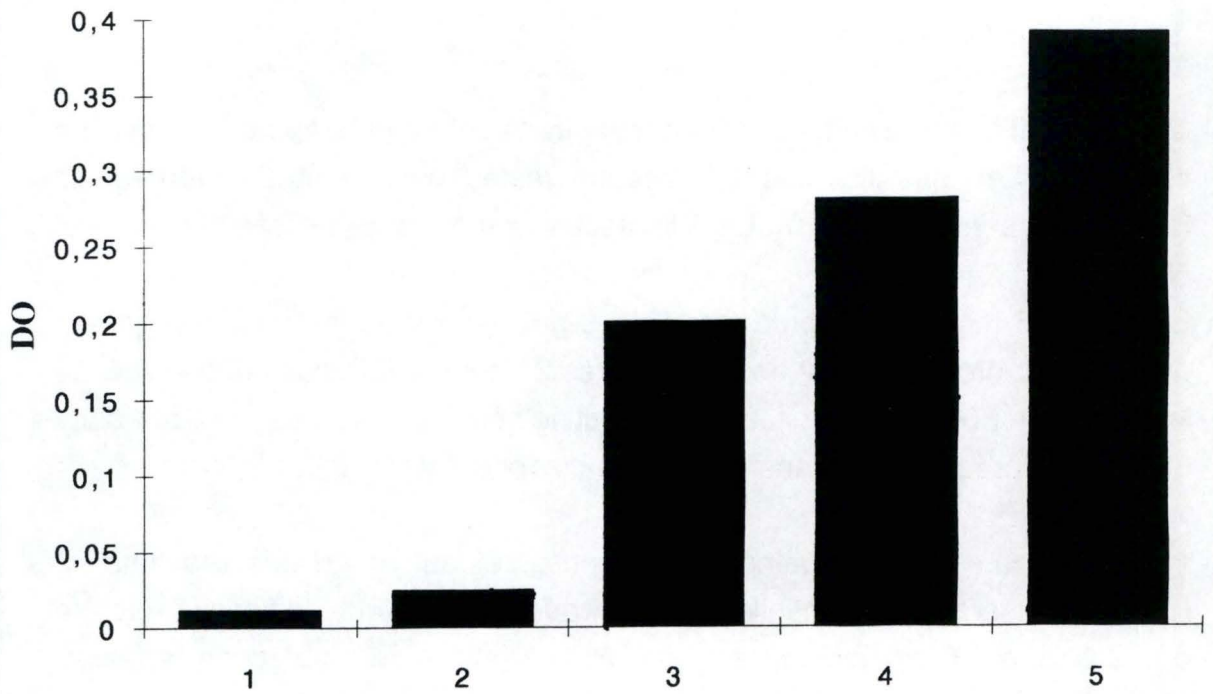


Figure 38 : Détermination de la quantité d'ADN optimale pour le plasmide pCMV β en présence de quantités variables de lipofectine.

Colonne 1 : témoin cellulaire.

Colonne 2 : 2 μ g de DNA et 5 μ l de lipides.

Colonne 3 : 2 μ g de DNA et 7 μ l de lipides.

Colonne 4 : 3 μ g de DNA et 5 μ l de lipides.

Colonne 5 : 3 μ g de DNA et 7 μ l de lipides.

Un deuxième test (cfr. figure 38) utilise les mêmes conditions que mentionnées précédemment (2 et 3 μg d'ADN; 5 et 7 μl de lipofectine) mais en présence d'un autre plasmide pCMV β contenant un gène reporter β -gal. Le maximum de production est également observé pour 3 μg d'ADN, quelque soit la quantité de lipides (cfr. colonnes 4 et 5 de la figure 38).

Les prochaines expériences seront donc réalisées avec 3 μg d'ADN et en présence de lipofectine.

1.3.2. Comparaison des plasmides d'expression contenant un gène d'intérêt et des lipides cationiques entre eux.

Selon la littérature, l'utilisation de la lipofectamine (lipide polycationique) donne de meilleurs résultats en transfection que la lipofectine (Hawley-Nelson *et al.*, 1993). Aussi allons nous comparer leur efficacité respective pour la transfection au moyen de nos deux plasmides (pSV β et pCMV β). Bien que les tendances qui se dégagent des expériences précédentes aient été confirmées à de nombreuses reprises dans des manipulations indépendantes, chacune d'entre elle n'a utilisé qu'un échantillon par condition et ne donne pas d'idée de la variabilité de la transfection lors d'un test.

Dans cette dernière expérience, mettant par la même occasion un terme à la première partie de notre travail, trois réplicats seront réalisés en vue de vérifier l'homogénéité de ces résultats. Rappelons également qu'il ne s'agissait ici que d'évaluer les meilleures conditions possibles de transfection pouvant être utilisable dans un système plus complexe d'infection-transfection.

Les deux lipides, ainsi que les deux plasmides, ont été comparés entre eux (cfr. figure 39). La lipofectamine montre une production de β -galactosidase plus élevée par rapport à ce qui est obtenu avec la lipofectine, et cela pour les deux plasmides (cfr. colonnes 4, 5, 8 et 9 de la figure 39). Cependant, la quantité de β -galactosidase obtenue est supérieure lorsque le plasmide pCMV β est utilisé (cfr. colonnes 8 et 9 de la figure 39).

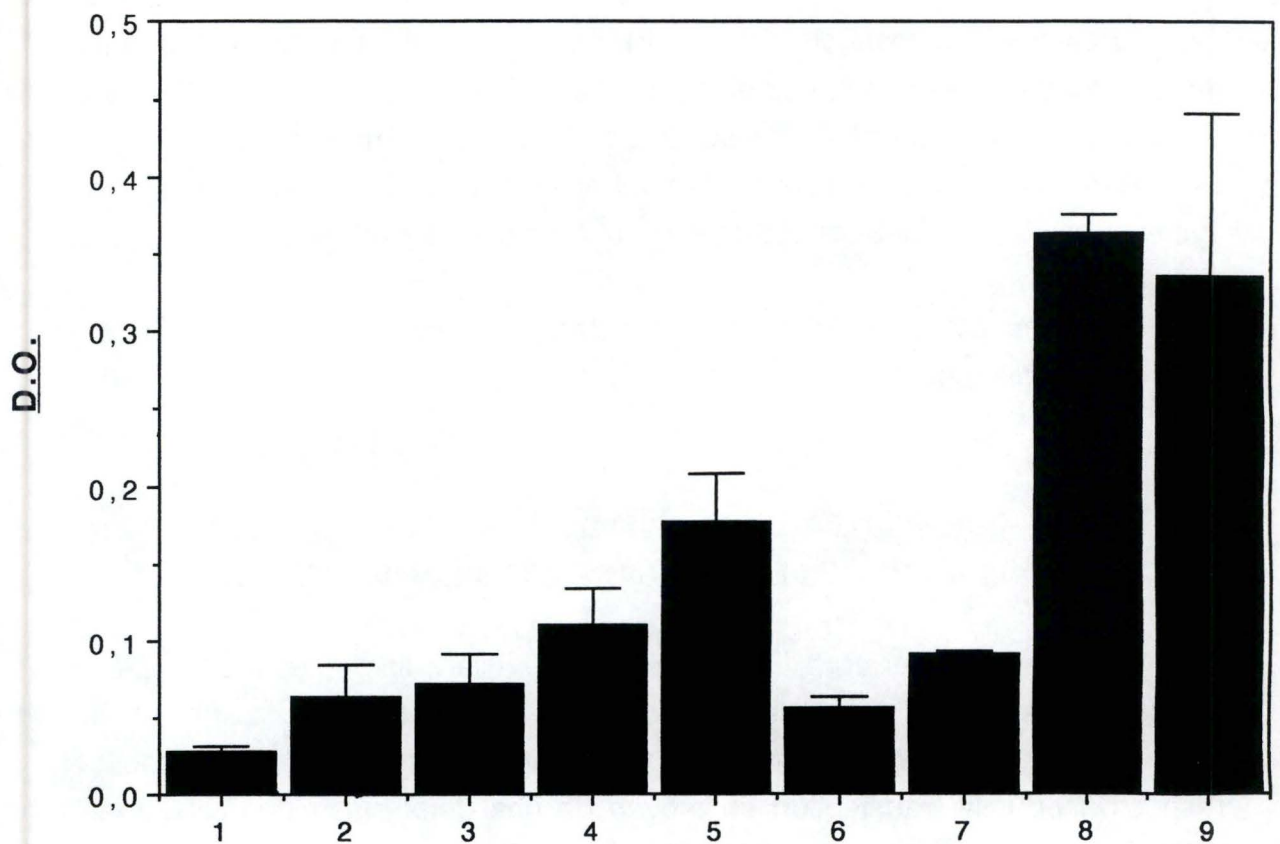


Figure 39 : Comparaison des lipides et des plasmides entre-eux.
La quantité d'ADN utilisée est de 3 μ g.

- Colonne 1 : témoin cellulaire.
- Colonne 2 : plasmide pSV β et 5 μ l de lipofectine.
- Colonne 3 : plasmide pSV β et 7 μ l de lipofectine.
- Colonne 4 : plasmide pSV β et 5 μ l de lipofectamine.
- Colonne 5 : plasmide pSV β et 7 μ l de lipofectamine.
- Colonne 6 : plasmide pCMV β et 5 μ l de lipofectine.
- Colonne 7 : plasmide pCMV β et 7 μ l de lipofectine.
- Colonne 8 : plasmide pCMV β et 5 μ l de lipofectamine.
- Colonne 9 : plasmide pCMV β et 7 μ l de lipofectamine.

Les conditions optimales de transfection des cellules CV1 adoptées pour la suite de notre travail sont donc 3 μg d'ADN et de 7 μl de lipofectamine.

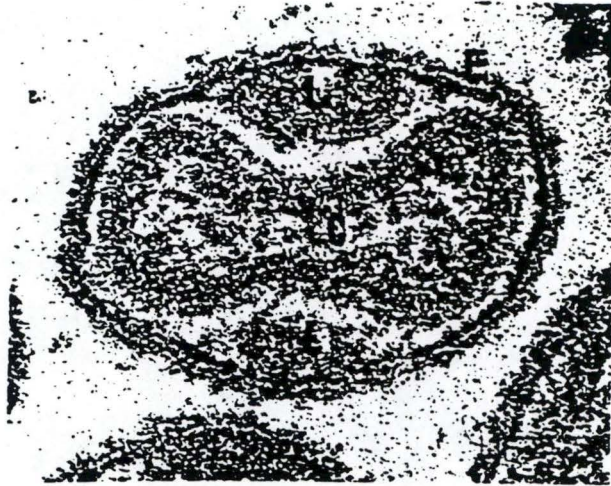


Figure 40 : Micrographie electronique d'une particule du virus de la Vaccine intracellulaire.

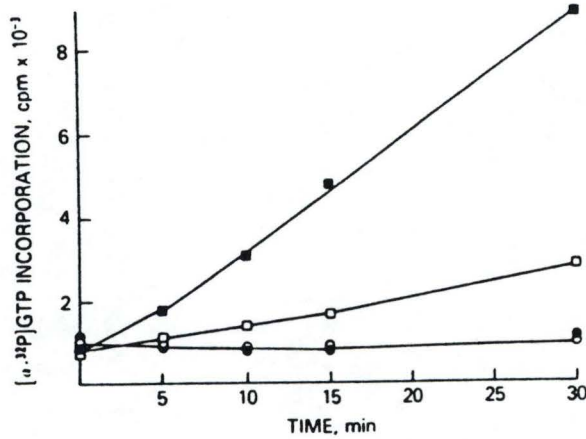


Figure 41 : Synthèse de polymérase T7 dans les cellules CV1 non infectées (●), infectées à l'aide du virus de la Vaccine (•), infectées et transfectées par un plasmide promoteur T7 (□) et cellules infectées à l'aide de la Vaccine T7(■) .

2. Expression transitoire d'un fragment du gène de la protéine F du BRSV (RB 94) dans le système d'infection Vaccine T7-transfection.

Le but de ce travail était d'exprimer transitoirement un fragment du gène de la protéine F du BRSV (RB 94) en cellules eucaryotes. Bernard Moss (1990) a mis au point un système d'expression transitoire très efficace en cellules eucaryotes. A cette fin, on dispose du virus de la Vaccine (cfr. figure 40) dans lequel le gène de l'ARN polymérase du bactériophage T7 a été intégré. La transcription continue de ce gène est sous dépendance du promoteur P7,5 des gènes EARLY et LATE de la Vaccine (Moss, 1990; Moss *et al.*, 1990) (cfr. figure 41). Les cellules eucaryotes ainsi infectées sont ensuite transfectées à l'aide d'un plasmide (pOS7) qui contient un gène d'intérêt sous dépendance d'un promoteur T7 reconnu par la polymérase T7. De plus, l'expression du gène est amplifiée par l'addition d'une région non traduite du virus de l'encephalomyocardie (ECMV) en aval de ce promoteur T7 (Vennema *et al.*, 1991; Elroy-Stein & Moss, 1990). Cette construction permet donc au gène d'intérêt d'utiliser la machinerie eucaryotique afin d'être exprimé dans le cytoplasme cellulaire. Ce système a été choisi en vue d'exprimer transitoirement le gène du fragment de la protéine F (F') en cellules eucaryotes.

2.1. Clonage d'un fragment du gène F dans le vecteur plasmidique pOS7.

2.1.1. Expression et détection d'un segment de la protéine F (F') en bactérie.

Nos études se sont focalisées sur l'expression de la sous-unité F1 du gène F du BRSV (RB 94). D'une part, la majorité des épitopes décrits (Arbiza *et al.*, 1992; Paradiso *et al.*, 1991; López *et al.*, 1993) sont situés sur ce fragment. D'autre part, la plupart des anticorps anti-F disponible dans notre laboratoire reconnaissent cette sous-unité F1.

Pour ce travail, nous avons pu profiter d'un plasmide pJLA-F' (construit au C.E.R. de Marloie) qui exprime le gène d'intérêt . Ce gène F' (codant pour la

1 ATG GCG ACA ACA GCC ATG AGG ATG ATC ATC AGC ATC ATC TTC ATC TCT ACC TAT GTG ACA
1 Met ala thr thr ala met arg met ile ile ser ile ile phe ile ser thr tyr val thr

61 CAT ATC ACT TTA TGC CAA AAC ATA ACA GAA GAA TTT TAT CAA TCA ACA TGC AGT GCA GTT
21 his ile thr leu cys gln asn ile thr glu glu phe tyr gln ser thr cys ser ala val

121 AGT AGA GGT TAC CTT AGT GCA TTA AGA ACT GGA TGG TAT ACA AGT GTG GTA ACA ATA GAG
41 ser arg gly tyr leu ser ala leu arg thr gly trp tyr thr ser val val thr ile glu

181 TTG AGC AAA ATA CAA AAA AAT GTA TGT AAC AGT ACT GAT TCA AAC GTG AAA TTA ATA AAG
61 leu ser lys ile gln lys asn val cys asn ser thr asp ser asn val lys leu ile lys

241 CAA GAA CTA GAA AGA TAC AAC AAT GCA GTA GTG GAA TTG CAG TCA CTT ATG CAA AAT GAA
81 gln glu leu glu arg tyr asn asn ala val val glu leu gln ser leu met gln asn glu

301 CCG GCC TCC TCC AGT AGA GCA AAA AGA GGG ATA CCA GAG TTG ATA CAT TAT AAA AGA AAC
101 pro ala ser ser ser arg ala lys arg gly ile pro glu leu ile his tyr lys arg asn

361 TCT ACA AAA AAG TTT TAT GGG CTA ATG GGC AAA AAG AGA AAA AGG AGA TTT TTA GGA TTC
121 ser thr lys lys phe tyr gly leu met gly lys lys arg lys arg arg phe leu gly phe

421 TTG CTA GGT AAT GGA TCT GCT AAT GCA AGT GGT GTA GCA GTG TCC AAA GTA CTA CAC CTG
141 leu leu gly ile gly ser ala ile ala ser gly val ala val ser lys val leu his leu

481 GAG GGA GAG GTG AAT AAA AAT AAA AAT GCA CTG CTA TCC ACA AAT AAA GCA GTA GTT AGT
161 glu gly glu val asn lys ile lys asn ala leu leu ser thr asn lys ala val val ser
GA-----

541 CTA TCC AAT GGA GTT AGT GTC CTA ACT AGC AAA GTA CTT GAT CTA AAG AAC TAT ATA GAC
181 leu ser asn gly val ser val leu thr ser lys val leu asp leu lys asn tyr ile asp

601 AAA GAG CTT CTA CCT AAA GTT AAC AAT CAT GAT TGT CAG ATA TCC AAC ATA GCA ACT GTG
201 lys glu leu leu pro lys val asn asn his asp cys gln ile ser asn ile ala thr val

661 ATA GAA TTC CAA CAA AAA AAC AAT AGA TTG TTG GAA ATT GCT AAG GAA TTT AGT GTA AAT
221 ile glu phe gln gln lys asn asn arg leu leu glu ile ala lys glu phe ser val asn

721 GCT GGT AAT ACC ACA CCC CTC AGT ACA TAC ATG TTG ACC AAT AGT GAA TTA CTA TCA CTA
241 ala gly ile thr thr pro leu ser thr tyr met leu thr asn ser glu leu leu ser leu

781 AAT AAT GAT ATG CCT ATA ACG AAT GAC CAA AAA AAG CTA ATG TCA AGT AAT GTT CAA ATA
261 ile asn asp met pro ile thr asn asp gln lys lys leu met ser ser asn val gln ile

841 GTC AGG CAA CAG AGT TAT TCC AAT ATG TCA GTG GTC AAA GAA GAG GTC ATG GCT TAT GTT
281 val arg gln gln ser tyr ser ile met ser val val lys glu glu val met ala tyr val

901 GTA CAA TTA CCT AAT TAT GGA GTT ATA GAC ACC CCC TGT TGG AAA CTA CAC ACC TCT CCA
301 val gln leu pro ile tyr gly val ile asp thr pro cys trp lys leu his thr ser pro

961 TTA TGC ACC ACT GAT AAT AAA GAA GGG TCA AAC ATC TGC TTA ACT AGG ACA GAT CGT GGG
321 leu cys thr thr asp asn lys glu gly ser asn ile cys leu thr arg thr asp arg gly

1021 TGG TAT TGT GAT AAT GCA GGC TCT GTG TCT TTT TTC CCT CAG GCA GAG ACA TGT AAA GTA
341 trp tyr cys asp asn ala gly ser val ser phe phe pro gln ala glu thr cys lys val

1081 CAA TCA AAT AGA GTG TTC TGT GAC ACA ATG AAC AGT TTA ACT CTG CCT ACT GAT GTT AAC
361 gln ser asn arg val phe cys asp thr met asn ser leu thr leu pro thr asp val asn

1141 TTA TGC AAC ACT GAC ATA TTC AAT GCA AAG TAT GAC TGT AAA ATA ATG ACA TCT AAA ACT
381 leu cys asn thr asp ile phe asn ala lys tyr asp cys lys ile met thr ser lys thr

1201 GAC ATA AGT AGC TCT GTA ATA ACT TCA ATA GGA GCT AAT GTA TCA TGC TAT GGG AAG ACA
401 asp ile ser ser ser val ile thr ser ile gly ala ile val ser cys tyr gly lys thr

1261 AAA TGT ACA GCC TCT AAT AAA AAT CGT GGA ATC ATA AAG ACT TTT TCC AAT GGG TGT GAT
421 lys cys thr ala ser asn lys asn arg gly ile ile lys thr phe ser asn gly cys asp

1321 TAT GTA TCA AAC AGA GGA GTT GAT ACT GTA TCT GTT GGT AAC ACA CTA TAT TAT GTA AAT
441 tyr val ser asn arg gly val asp thr val ser val gly asn thr leu tyr tyr val asn

461 lys leu glu gly lys ala leu tyr ile lys gly glu pro ile ile asn tyr tyr asp pro

 1441 CTA GTA TTT CCT TCT GAT GAG TTT GAT GCA TCA ATT GCC CAA GTA AAC GCA AAA ATA AAC
 481 leu val phe pro ser asp glu phe asp ala ser ile ala gln val asn ala lys ile asn

 1501 CAA AGC CTG GCT TTC ATA CGT CGA TCT GAT GAG TTA CTT CAC AGT GTA GAT GTA GGA AAA
 501 gln ser leu ala phe ile arg arg ser asp glu leu leu his ser val asp val gly lys
 -----GTA GAT GGA TAA
 1561 TCC ACC ACA AAT GTA GTA ATT ACT ACT ATT ATC ATA GTG ATA GTA GTA GTG ATA TTA ATG
 521 ser thr thr asn val val ile thr thr ile ile ile val ile val val val ile leu met
 TCC ACC **AGA TCT** GCA GTA
 1621 TTA ATA GCT GTA GGA TTA CTG TTT TAC AGT AAG ACC AGG AGT ACT CCT ATC ATG TTA GGA
 541 leu ile ala val gly leu leu phe tyr ser lys thr arg ser thr pro ile met leu gly

 1681 AAG GAT CAG CTT AGT GGT ATC AAC AAT CTT TCC TTT AGT AAA TGA
 561 lys asp gln leu ser gly ile asn asn leu ser phe ser lys OPA

Figure 42 : Séquence nucléotidique codante et séquence en acides aminés déduite de la protéine F du BRSV (souche RB 94). La localisation des primers "forward" et "reverse" sont indiqués en dessous de la séquence nucléotidique. La séquence amplifiée est indiquée par -----.

sous unité F1) est exempt des séquences codante pour le peptide fusogène, la zone d'ancrage et la séquence protéique intracytoplasmique.

Afin de mieux situer les différentes séquences bordant ce gène F', revenons brièvement sur la procédure de clonage qui avait été utilisée lors de la construction du plasmide pJLA-F' (C.E.R. Marloie).

A. Description de la construction de pJLA-F'.

La fragment du gène de la protéine F (F'), sous cloné dans le vecteur pJLA-502, a été obtenu par amplification PCR d'une matrice constituée du gène de la protéine F (cloné dans le vecteur pBluescript à partir de deux primers) :

- le primer "forward" permet de créer un site de restriction *Nco1* et un ATG (pour l'initiation de la transcription) sur la sous-unité F1.
- le primer "reverse" insère un site stop ainsi que sites de restriction en aval de celui-ci (*Bgl II* et *Pst I*).

L'insert clivé aux sites *Nco1* et *BglIII* a été introduit entre les sites *Nco1* et *BamH1* de pJLA-502 afin de construire le plasmide pJLA-F'.

La figure 42 représente la séquence complète du gène de la protéine F (souche RB 94) ainsi que la séquence amplifiée en vue d'être insérée dans le vecteur pJLA-502.

B. Détection de la protéine F' exprimée en bactérie.

La construction du plasmide pJLA-F' n'a d'intérêt que si la protéine F' exprimée est bien reconnue par un des anticorps monoclonaux "anti-protéine F" du RSV disponible dans notre laboratoire. La séquence insérée pourrait simplement ne pas contenir le site de fixation de l'anticorps, sous sa forme native. L'anticorps utilisé au cours de ce travail est le monoclonal AK13A2 d'isotype IgG1 dont la localisation de l'épitope a été définie (López *et al.*, 1993). Celui-ci nous servira ultérieurement pour vérifier l'expression du fragment de la protéine F' en cellules eucaryotes.



Figure 43 : Détection en Western blot par l'anticorps AK13A2 de l'expression en bactéries des plasmides pJLA-502 (piste B) et pJLA-F' (piste C). La piste A est la détection de la sous-unité F1 du HRSV (souche A2).

L'expression de la protéine F' est induite à une température de 42 °C. En effet, la transcription du gène d'intérêt est sous dépendance des promoteurs en tandem PR et PL du bactériophage λ . La transcription de ce gène est réprimé par la protéine cIts S57 du bactériophage λ à une température comprise entre 28 et 30 °C. Par contre, elle est induite à 42 °C. En parallèle, l'induction du plasmide pLJA-502 exempt du gène de la protéine F' a été réalisée et servira de contrôle négatif. Le contrôle positif est le virus HRSV souche A2.

Suite à une induction de 4 heures à 42 °C chaque culot bactérien, récupéré après centrifugation, est resuspendu dans du tampon Laemmli. Chacun des culots a été dilué deux fois. Les échantillons traités à l'aide de mercaptoethanol sont chauffés 10 minutes à 100 °C. Ils ont ensuite été déposés sur gel SDS-PAGE (12 %). Après transfert sur nitrocellulose, la détection est réalisée par l'anticorps AK13A2 (cfr. figure 43). Cet anticorps détecte un fragment de 47 kD que correspond à la sous-unité F1 (dissociée de la sous-unité F2 en condition réductrice). De même cet anticorps reconnaît un fragment de 39 kD (piste A) de pJLA-F'. Ce poids moléculaire correspond par ailleurs à celui calculé pour le fragment F' à partir de la séquence déduite en aa. L'anticorps ne détecte pas cette protéine en piste B qui correspond au lysat bactérien du plasmide pJLA-502, ce qui atteste de la spécificité de cette détection.

2.1.2. Construction du plasmide pOS-F'.

Le vecteur pOS7 de 3,6 kb (Moss, 1990) est issu du plasmide pBR322 (low replication). Il permet l'expression transitoire du gène en cellules eucaryotes par un système d'infection-transfection.

Le gène d'intérêt est sous la dépendance d'un promoteur et d'un terminateur T7. Une région non traduite (ECMV) a été insérée entre le promoteur T7 et le site multiple de clonage. Cette région permet d'augmenter la stabilité de l'ARN messager et permet une meilleure interaction ribosome-ARN. L'expression de la protéine peut ainsi être augmentée.

La figure 44 représente la construction plasmidique effectuée en vue du clonage du gène F' dans le vecteur pOS7.

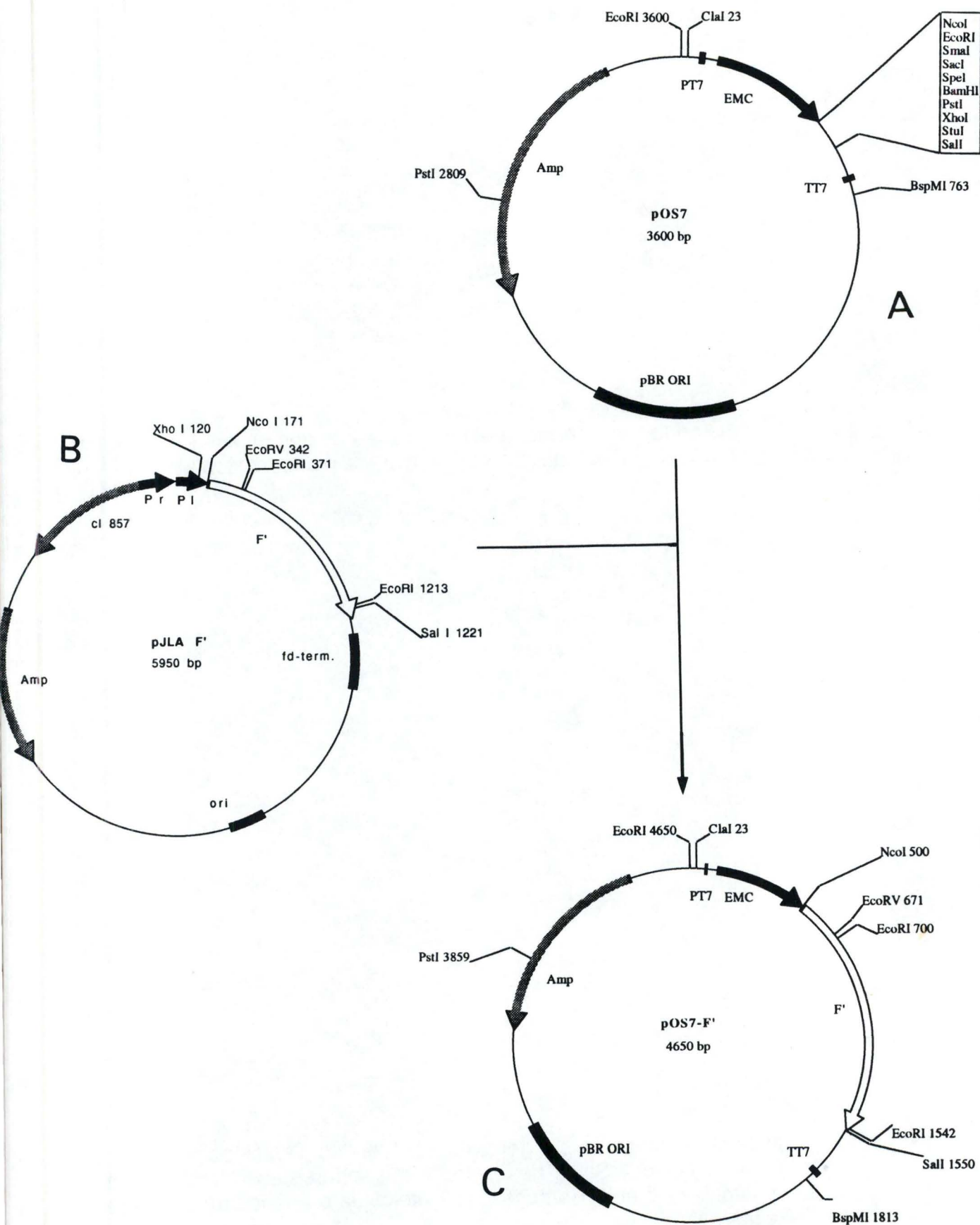


Figure 44 : Construction plasmidique effectuée en vue du clonage du gène F' dans les vecteur pOS7.

- A plasmide pOS7
- B plasmide pJLA-F'
- C plasmide pOS-F'

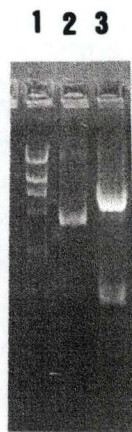


Figure 45 A : Résultats de la migration sur gel d'agarose 1 % des plasmides restreints pOS7 (2) et pJLA F' (3). La piste 1 est l'étalon de poids moléculaire 2.

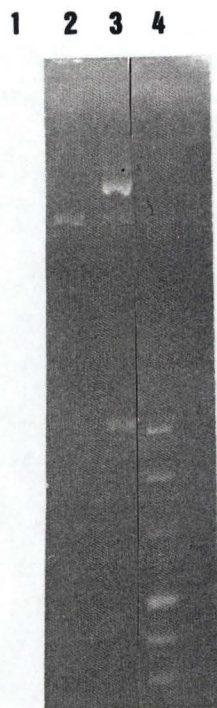


Figure 45 B : Résultats de la migration sur gel d'agarose 1 % des plasmides pOS7 (2) et pOSF' (3) restreints *Nco1/Sal1* . Les pistes 1 et 4 sont respectivement les étalons de poids moléculaire 2 et 8. Remarquons toutefois la présence de plasmides pOSF' non restreint.

Les plasmides pJLA-F' et pOS7 ont été restreints en une seule étape par les enzymes *Nco1* et *Sa1*. La vérification s'est faite sur gel d'agarose 1 % en présence des étalons de poids moléculaire 2 (cfr. figure 45 A).

Deux fragments de 4900 pb et 1100 pb sont ainsi obtenus (cfr. piste 3 de la figure 45) pour le plasmide pJLA-F'. Le fragment de 1100 pb a été extrait par la technique du Gene Clean II décrite dans matériel et méthodes (point 1.7.).

Les fragments obtenus pour pOS7 sont de 3550 pb et moins de 100 pb (cfr. piste 2 de la figure 45), sur un gel d'agarose il est peu probable que ce dernier soit visible vu sa taille. L'extraction du plasmide doublement restreint a également été réalisée selon la méthode Gene Clean II.

La pureté du plasmide restreint et de l'insert après extraction a également été vérifiée sur gel d'agarose.

La ligation a eu lieu en présence d'une quantité de 200 ng du plasmide restreint (3,6 kb) et 30 ng d'insert (1050 pb) ainsi que du tampon de ligation et de la ligase T4. Le tout est incubé 16 heures à 14 °C.

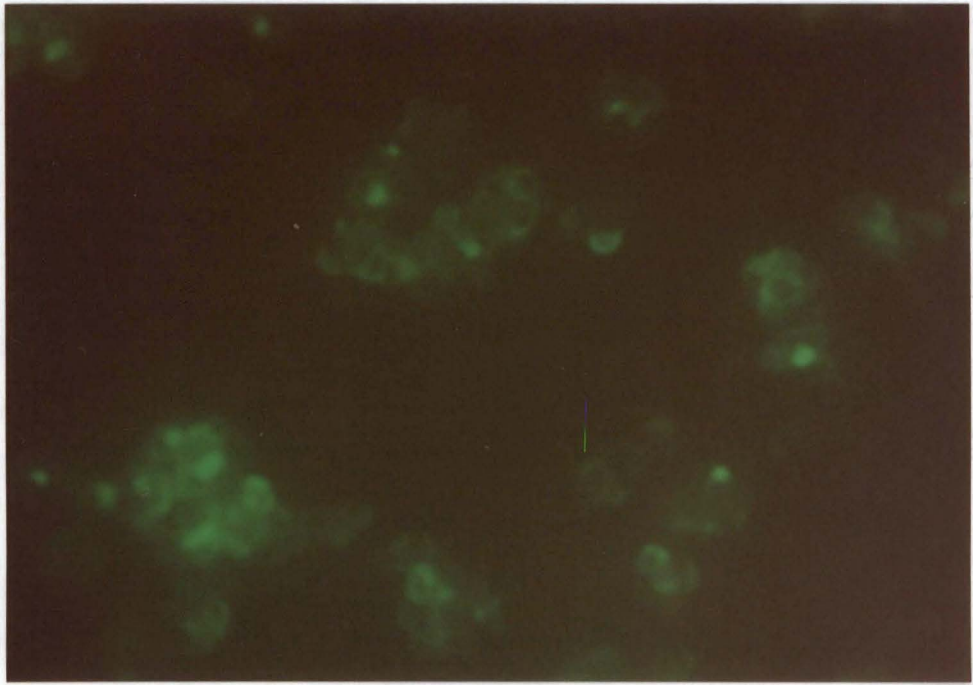
Les cellules compétentes *E.Coli* XL1-Blue ont été transformées par le mélange de ligation puis étalées sur boîte de Petri contenant du milieu sélectif NZYM-ampicilline. Sur l'ensemble des colonies obtenues, 28 ont été choisies au hasard. Pour chacune de ces colonies, les plasmides ont été extraits (miniprep) puis restreints par l'enzyme de restriction *Eco R1*.

Si le plasmide contient bien l'insert de 1100 pb on devrait obtenir trois fragments de 2900, 900 et 800 pb. En effet, le plasmide pOS-F' devrait contenir trois sites *Eco R1* (cfr. figure 44 C) :

- Un site est situé sur le plasmide pOS7.
- Un site est situé dans le gène de la protéine F'.
- Un site est situé dans l'insert extrait de pJLA-F'.

Par contre, si l'insert n'est pas présent, seuls deux fragments (de 3000 et 600 pb) seront visibles.

Sur les 28 restrictions déposées sur gel d'agarose 1 %, un clone apparaît positif. La construction obtenue a été vérifiée par une double restriction *Nco1/Sa1* générant deux fragments correspondant à la matrice et à l'insert (cfr. figure 45 B).



2.2. Expression du gène de la protéine F' en cellules eucaryotes.

2.2.1. Optimisation des conditions d'infection.

Une fois construit le plasmide pOSF' a été introduit dans le système d'expression transitoire décrit précédemment. Les cellules CV1 sont infectées à raison d'une TCID₅₀ pendant une heure par puits, puis transfectées selon le protocole mis au point dans la première partie de ces résultats (point 1.3.2.), c'est-à-dire 3 µg d'ADN et 7 µl de lipofectamine.

Pour chaque test, des contrôles ont été réalisés :

- contrôle négatif :
 - témoin cellulaire (pas d'infection-transfection).
 - témoin viral (infection uniquement).
 - témoin infection-transfection en présence du plasmide pOS7.
- contrôle positif : cellules infectées par le virus HRSV souche A2.

La majorité des études en matière d'infection-transfection détectent l'expression de la protéine d'intérêt par immunofluorescence sur des cellules fixées (Heminway *et al.*, 1994). Par conséquent, la production de la protéine dans ce système a tout d'abord été évaluée par ce type de test. Les cellules infectées-transfectées ont été fixées à l'acétone sur le fond du puits. La détection en immunofluorescence a été réalisée par l'anticorps monoclonal AK13A2. La photo 1 représente le marquage des cellules infectées par la Vaccine T7 et transfectées par le plasmide pOS-F'. On remarque une expression notable de la protéine dans les cellules infectées. D'une part, bien que cette étude montre une expression du fragment F' dans le système utilisé, celle-ci reste néanmoins une mesure "semi-quantitative" de la production. De plus, rien ne permet d'affirmer que les conditions utilisées dans ce test sont optimales et permettent la production maximale de la protéine. D'autre part, beaucoup de cellules ont été lysées par suite de l'infection à la Vaccine.

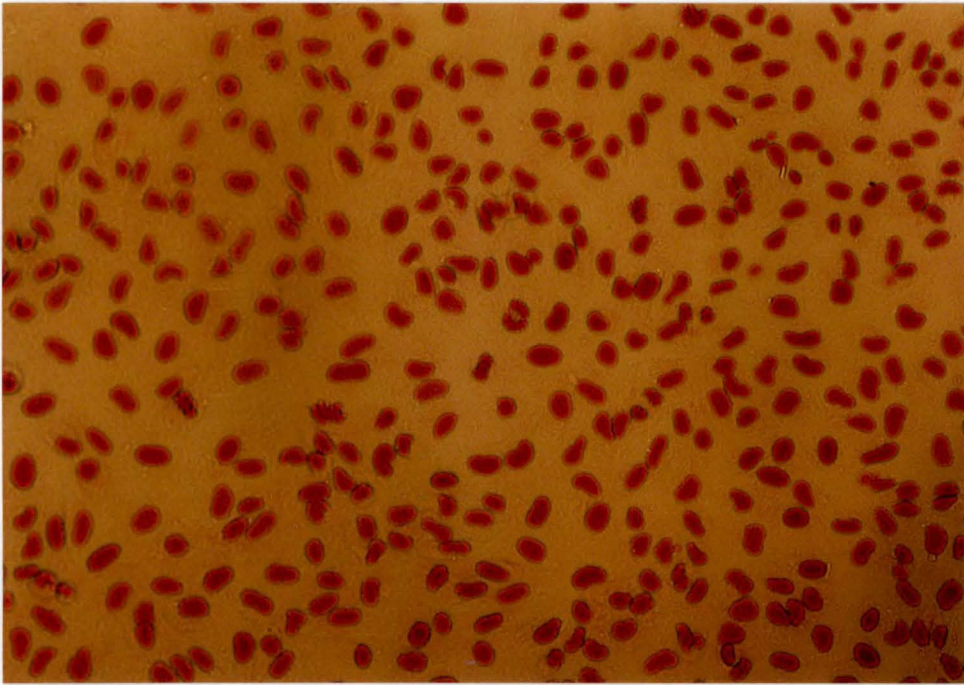


Photo 2 : coloration au Giemsa des noyaux cellulaires avant infection-transfection.

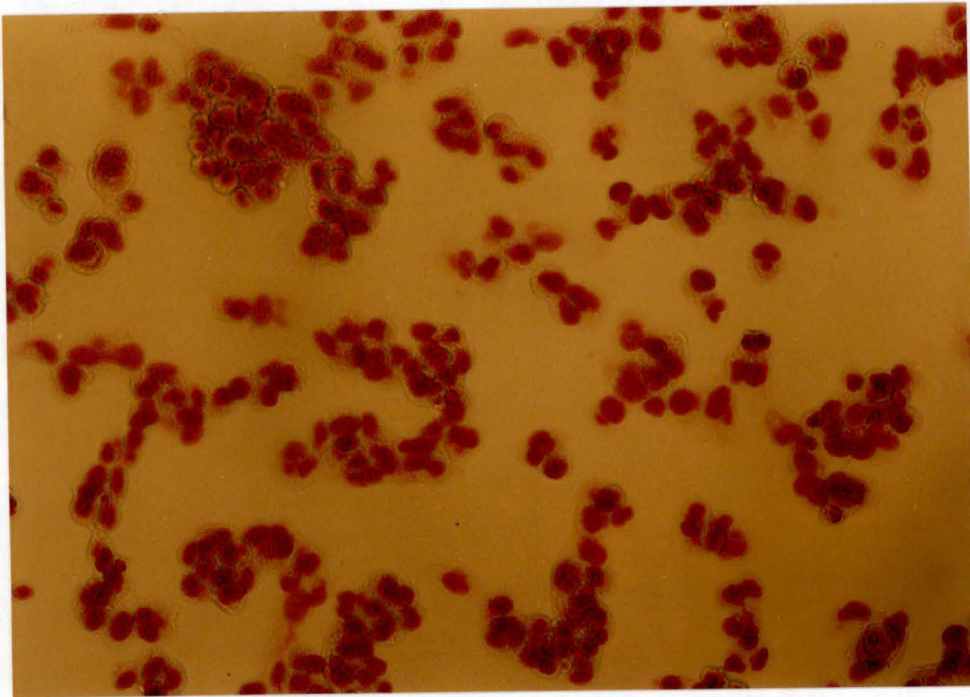


Photo 3 : Coloration eu Giemsa des noyaux cellulaires après infection-transfection.

A ce titre, les photos 2 et 3 indiquent l'état du tapis cellulaire avant et après infection-transfection.

Au vu de ces données, il serait bon d'estimer la production de la protéine F' tout en limitant la quantité viral et le temps d'infection. Dès lors, nous avons décidé de faire varier le nombre de TCID₅₀ par cellules lors de l'infection ainsi que le temps d'infection et estimer la production résultante par cette technique. Les résultats sont repris dans le tableau ci-dessous. La détection en immunofluorescence n'est pas quantitative.

Temps d'infection	Nombre de TCID ₅₀ par cellule	Estimation de la réponse
30 minutes	1	+
1 heure	0,5	+++
	1	+++
	1,5	++

Le marquage optimal est donc obtenu pour une infection d'une heure en présence 0,5 ou 1 TCID₅₀ de Vaccine T7. Les conditions d'infection-transfection dans lesquelles se réaliseront le reste de notre travail seront donc :

- Une heure d'infection pour 0,5 TCID₅₀.
- Transfection de 3 µg d'ADN et 7 µl de lipofectamine.

En outre, cette procédure nous permettra de limiter quelque peu la lyse cellulaire.

2.2.2. Mise au point de la préparation d'antigène pour une détection au moyen de la technique de Dot blot.

Bien qu'ayant pu mettre en évidence l'expression de la protéine F', la détection par immunofluorescence a le désavantage de ne permettre qu'un seul test par puits. Il serait donc intéressant de mettre au point d'autres

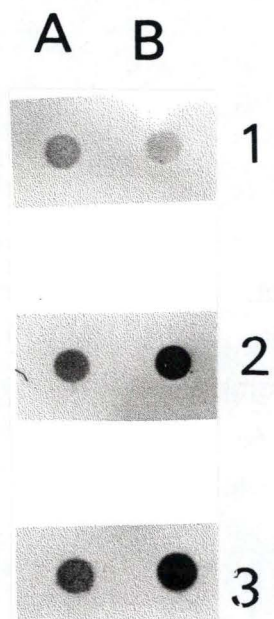


Figure 46 : Détection par la technique du Dot blot de différentes préparations d'antigène provenant de l'expression de pOS7 (A) et pOSF'(B). Les différentes préparations d'antigène testés sont le lysat cellulaire (1), le surnageant de culture (2) et le surnageant total (composé des cellules lysées par gel-dégel et du surnageant de culture; 3).

détections permettant de réaliser plusieurs tests pour chaque puits (une variabilité entre chaque transfection ayant été montrée lors de sa mise au point). De plus, des analyses plus approfondies (antigénicité, taille,...) nécessite l'utilisation d'autres moyens de détection.

La première étape a été la détection de l'antigène par la technique de Dot blot. L'étape suivante a été la détection de la protéine en Western Blot.

Les cellules après infection-transfection, ont été lavées au PBS puis lysées en présence de 300 μ l par puits de différents tampons de lyse (RIPA, NP40, octyl, méthode gel-dégel). Une quantité d'antigène correspondant à 100 μ l du lysat cellulaire a été déposée sur nitrocellulose et analysée quant à sa réactivité vis-à-vis de l'anticorps AK13A2. Les résultats obtenus, par Dot blot, pour ces lysats cellulaires (cfr. piste B1 de la figure 46) ne permettent pas de montrer de détection spécifique par l'anticorps par rapport à un témoin constitué de lysat cellulaire dans un système d'infection-transfection pOS7.

Vu l'importance de la lyse cellulaire observée après infection-transfection (cfr. photo 2 et 3), il nous est apparu intéressant d'évaluer la présence de la protéine F'. Dans ce contexte, le surnageant de culture (3 ml final) a été testé en Dot blot quant à sa réactivité par rapport à l'anticorps AK13 A2.

La piste B2 de la figure 46 montre que la protéine F' est détectée spécifiquement par la technique de Dot blot dans 500 μ l du surnageant de culture. Une majorité de protéine F' se trouve donc bien dans ce surnageant.

La dernière étape a consisté à tester la totalité de la culture. En effet, si aucune détection n'a pu être obtenue sur lysat cellulaire en Dot blot, la révélation en immunofluorescence a cependant montré que l'antigène était présent dans les cellules.

Afin de tester la totalité de la culture, les cellules et le surnageant de culture (surnageant total) ont subi trois cycles de gel-dégel puis ont été centrifugés 15 minutes à 1500 rpm. Un dot blot a été réalisé en présence de 200 μ l de surnageant total (cfr. piste B3 de la figure 46). On note une meilleure détection de la protéine F' que lors de l'utilisation de surnageant seul, et ce pour un volume de moitié inférieur.

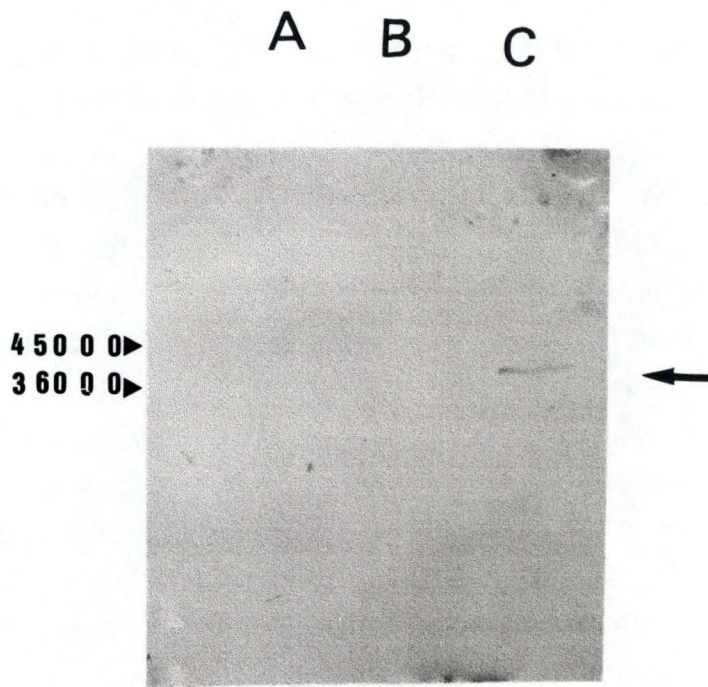


Figure 47 : Détection en Western blot par l'anticorps AK13A2 de l'expression transitoire en cellules eucaryotes de la protéine F'.

2.2.3. Analyse de la protéine F' en Western blot.

Après avoir montré une détection de la protéine F' suite à un marquage en immunofluorescence et par la technique de Dot blot, la technique du Western blot a été utilisée afin d'estimer la masse moléculaire de cette protéine. Notons toutefois que les infections-transfections ont été réalisées sans FCS (fetal calf serum) afin d'éviter une surcharge protéique.

Dans un premier temps, il nous fallait vérifier l'intégrité de la protéine F'. Cette protéine exprimée en cellules eucaryotes a donc été testée en Western blot afin de déterminer sa masse moléculaire. Le volume maximum déposé sur gel SDS-PAGE ne doit jamais dépasser 30 μ l. Afin de limiter le volume de départ et de garder une quantité analogue en antigène, les échantillons ont été concentrés par précipitation à l'acétone froide. A cette fin, 500 μ l de surnageant total ont été précipités à l'acétone puis resuspendus dans 20 μ l de tampon Laemmli. Le protocole utilisé pour la réalisation du Western blot a été décrit dans le matériel et méthodes (point 2.5.2.D). La révélation s'est faite en présence d'anticorps AK13A2 (cfr. figure 47). La masse moléculaire a été évaluée à 38,7 kD valeur proche de la masse moléculaire estimée.

2.3. Expression transitoire de fragments linéaires dans un système d'infection-transfection (Vaccine T7).

Ce travail s'inscrit plus particulièrement dans le cadre de la localisation d'épitopes sur la protéine F du BRSV. A cet effet, il convient de diminuer la séquence reconnue par l'anticorps monoclonal. Pour ce faire, il serait intéressant d'obtenir des fragments plus courts du gène de la protéine F' dans pOS7. Pour éviter le travail long et fastidieux du clonage de gène de plus en plus petits, la technique d'Express Amp (Matériel et méthodes point 1.11) a été utilisée. Elle consiste à ajouter à la séquence à exprimer une cassette (WT-T7) contenant un promoteur T7 (reconnu par la polymérase T7) et un site de liaison aux ribosomes (RBS) contenu dans une séquence non traduite (issu du virus de la mosaïque du tabac). Cette démarche a été réalisée par amplifications successives (PCR). Cette méthode permet d'obtenir des

1 ATG GCG ACA ACA GCC ATG AGG ATG ATC ATC AGC ATC ATC TTC ATC TCT ACC TAT GTG ACA
 1 Met ala thr thr ala met arg met ile ile ser ile ile phe ile ser thr tyr val thr

61 CAT ATC ACT TTA TGC CAA AAC ATA ACA GAA GAA TTT TAT CAA TCA ACA TGC AGT GCA GTT
 21 his ile thr leu cys gln asn ile thr glu glu phe tyr gln ser thr cys ser ala val

121 AGT AGA GGT TAC CTT AGT GCA TTA AGA ACT GGA TGG TAT ACA AGT GTG GTA ACA ATA GAG
 41 ser arg gly tyr leu ser ala leu arg thr gly trp tyr thr ser val val thr ile glu

181 TTG AGC AAA ATA CAA AAA AAT GTA TGT AAC AGT ACT GAT TCA AAC GTG AAA TTA ATA AAG
 61 leu ser lys ile gln lys asn val cys asn ser thr asp ser asn val lys leu ile lys

241 CAA GAA CTA GAA AGA TAC AAC AAT GCA GTA GTG GAA TTG CAG TCA CTT ATG CAA AAT GAA
 81 gln glu leu glu arg tyr asn asn ala val val glu leu gln ser leu met gln asn glu

301 CCG GCC TCC TCC AGT AGA GCA AAA AGA GGG ATA CCA GAG TTG ATA CAT TAT AAA AGA AAC
 101 pro ala ser ser ser arg ala lys arg gly ile pro glu leu ile his tyr lys arg asn

361 TCT ACA AAA AAG TTT TAT GGG CTA ATG GGC AAA AAG AGA AAA AGG AGA TTT TTA GGA TTC
 121 ser thr lys lys phe tyr gly leu met gly lys lys arg lys arg arg phe leu gly phe

421 TTG CTA GGT ATT GGA TCT GCT ATT GCA AGT GGT GTA GCA GTG TCC AAA GTA CTA CAC CTG
 141 leu leu gly ile gly ser ala ile ala ser gly val ala val ser lys val leu his leu

TCC ATG GTA CTA CAC CTG

481 GAG GGA GAG GTG AAT AAA ATT AAA AAT GCA CTG CTA TCC ACA AAT AAA GCA GTA GTT AGT
 161 glu gly glu val asn lys ile lys asn ala leu leu ser thr asn lys ala val val ser
 GA-----

541 CTA TCC AAT GGA GTT AGT GTC CTA ACT AGC AAA GTA CTT GAT CTA AAG AAC TAT ATA GAC
 181 leu ser asn gly val ser val leu thr ser lys val leu asp leu lys asn tyr ile asp

601 AAA GAG CTT CTA CCT AAA GTT AAC AAT CAT GAT TGT CAG ATA TCC AAC ATA GCA ACT GTG
 201 lys glu leu leu pro lys val asn asn his asp cys gln ile ser asn ile ala thr val

661 ATA GAA TTC CAA CAA AAA AAC AAT AGA TTG TTG GAA ATT GCT AAG GAA TTT AGT GTA AAT
 221 ile glu phe gln gln lys asn asn arg leu leu glu ile ala lys glu phe ser val asn

721 GCT GGT ATT ACC ACA CCC CTC AGT ACA TAC ATG TTG ACC AAT AGT GAA TTA CTA TCA CTA
 241 ala gly ile thr thr pro leu ser thr tyr met leu thr asn ser glu leu leu ser leu

781 ATT AAT GAT ATG CCT ATA ACG AAT GAC CAA AAA AAG CTA ATG TCA AGT AAT GTT CAA ATA
 261 ile asn asp met pro ile thr asn asp gln lys lys leu met ser ser asn val gln ile

841 GTC AGG CAA CAG AGT TAT TCC ATT ATG TCA GTG GTC AAA GAA GAG GTC ATG GCT TAT GTT
 281 val arg gln gln ser tyr ser ile met ser val val lys glu glu val met ala tyr val

901 GTA CAA TTA CCT ATT TAT GGA GTT ATA GAC ACC CCC TGT TGG AAA CTA CAC ACC TCT CCA
 301 val gln leu pro ile tyr gly val ile asp thr pro cys trp lys leu his thr ser pro

961 TTA TGC ACC ACT GAT AAT AAA GAA GGG TCA AAC ATC TGC TTA ACT AGG ACA GAT CGT GGG
 321 leu cys thr thr asp asn lys glu gly ser asn ile cys leu thr arg thr asp arg gly

1021 TGG TAT TGT GAT AAT GCA GGC TCT GTG TCT TTT TTC CCT CAG GCA GAG ACA TGT AAA GTA
 341 trp tyr cys asp asn ala gly ser val ser phe phe pro gln ala glu thr cys lys val

1081 CAA TCA AAT AGA GTG TTC TGT GAC ACA ATG AAC AGT TTA ACT CTG CCT ACT GAT GTT AAC
 361 gln ser asn arg val phe cys asp thr met asn ser leu thr leu pro thr asp val asn

1141 TTA TGC AAC ACT GAC ATA TTC AAT GCA AAG TAT GAC TGT AAA ATA ATG ACA TCT AAA ACT
 381 leu cys asn thr asp ile phe asn ala lys tyr asp cys lys ile met thr ser lys thr

1201 GAC ATA AGT AGC TCT GTA ATA ACT TCA ATA GGA GCT ATT GTA TCA TGC TAT GGG AAG ACA
 401 asp ile ser ser ser val ile thr ser ile gly ala ile val ser cys tyr gly lys thr

1261 AAA TGT ACA GCC TCT AAT AAA AAT CGT GGA ATC ATA AAG ACT TTT TCC AAT GGG TGT GAT
421 lys cys thr ala ser asn lys asn arg gly ile ile lys thr phe ser asn gly cys asp
-----*
1321 TAT GTA TCA AAC AGA GGA GTT GAT ACT GTA TCT GTT GGT AAC ACA CTA TAT TAT GTA AAT
441 tyr val ser asn arg gly val asp thr val ser val gly asn thr leu tyr tyr val asn
1381 AAG CTA GAG GGG AAA GCA CTC TAT ATA AAG GGT GAA CCA ATT ATT AAT TAC TAT GAT CCA
461 lys leu glu gly lys ala leu tyr ile lys gly glu pro ile ile asn tyr tyr asp pro
1441 CTA GTA TTT CCT TCT GAT GAG TTT GAT GCA TCA ATT GCC CAA GTA AAC GCA AAA ATA AAC
481 leu val phe pro ser asp glu phe asp ala ser ile ala gln val asn ala lys ile asn
1501 CAA AGC CTG GCT TTC ATA CGT CGA TCT GAT GAG TTA CTT CAC AGT GTA GAT GTA GGA AAA
501 gln ser leu ala phe ile arg arg ser asp glu leu leu his ser val asp val gly lys
1561 TCC ACC ACA AAT GTA GTA ATT ACT ACT ATT ATC ATA GTG ATA GTA GTA GTG ATA TTA ATG
521 ser thr thr asn val val ile thr thr ile ile ile val ile val val val ile leu met
1681 TTA ATA GCT GTA GGA TTA CTG TTT TAC AGT AAG ACC AGG AGT ACT CCT ATC ATG TTAGGA
541 leu ile ala val gly leu leu phe tyr ser lys thr arg ser thr pro ile met leu gly
1681 AAG GAT CAG CTT AGT GGT ATC AAC AAT CTT TCC TTT AGT AAA TGA
561 lys asp gln leu ser gly ile asn asn leu ser phe ser lys OPA

Figure 48 : Séquence nucléotidique codante et séquence en acides aminés déduite de la protéine F du BRSV (souche RB 94). Les primers "reverse" 2 (—) et 6 (—) ainsi que le primer "forward" () sont indiqués.



1 2 3 4 5

Figure 49 : Migration sur gel d'agarose 2 % des amplifications PCR des fragments F2' (obtenus avant -piste 2- et après -piste 3- la deuxième amplification) et des fragments F6' (avant piste -4- et après -piste 5- la deuxième amplification). La piste 1 est la migration du poids moléculaire 8.

"gènes" de tailles variables possédant la cassette WT-T7 en un temps très court (24 heures au total).

2.3.1. Production de séquences linéaires de différentes tailles.

Deux fragments recouvrant en partie la séquence du gène de la protéine F et de tailles différentes ont été amplifiés par PCR. Les amplifications ont été réalisées sur un vecteur Bluescript contenant le gène F complet. Le primer "forward" utilisé comporte 33 nucléotides, 22 s'hybrident au début de la séquence codante de F et permet la première amplification. Les 11 autres nucléotides constituant l'extrémité 5', sont complémentaires de la cassette WT7 et permettent suite à une deuxième étape d'amplification de disposer de la séquence du promoteur T7.

Deux types de primers "reverse" ont été utilisés en vue d'amplifier des fragments de tailles différentes :

- le fragment F'2 de 753 pb a été amplifié à partir d'un primer 2 "reverse" qui se lie entre les nucléotides 1188 et 1216 (cfr. figure 48).
- le fragment F'6 de 894 pb amplifié à partir du primer 6 "reverse" qui se fixe entre la position 1328 et à la position 1357 sur les nucléotides (cfr. figure 48).

La cassette d'expression *in vitro* WT-T7 est ensuite ajoutée par amplification PCR (cfr. point 1.11. du matériel et méthodes). La figure 49 montre le résultat des amplifications successives des fragments F'2 et F'6. On peut remarquer une augmentation de la taille des fragments de gènes amplifiés et purifiés suite à l'addition de la cassette d'expression WT-T7.

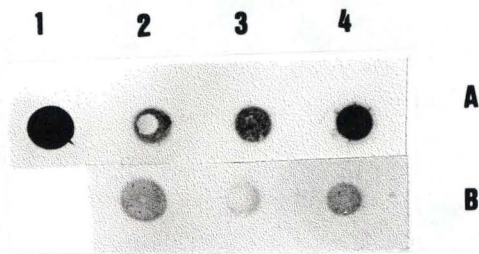


Figure 50 : Détection en Dot blot par l'anticorps AK13A2 de l'expression des séquences linéaires (piste B2 séquence F2' et piste B4 séquence F6'). La piste A est un contrôle de l'expression transitoire (virus RSV : 1; Témoin cellulaire : 2; Infection-transfection par le plasmide pOS7 : 3; et Infection-transfection par le plasmide pOSF' : 4).

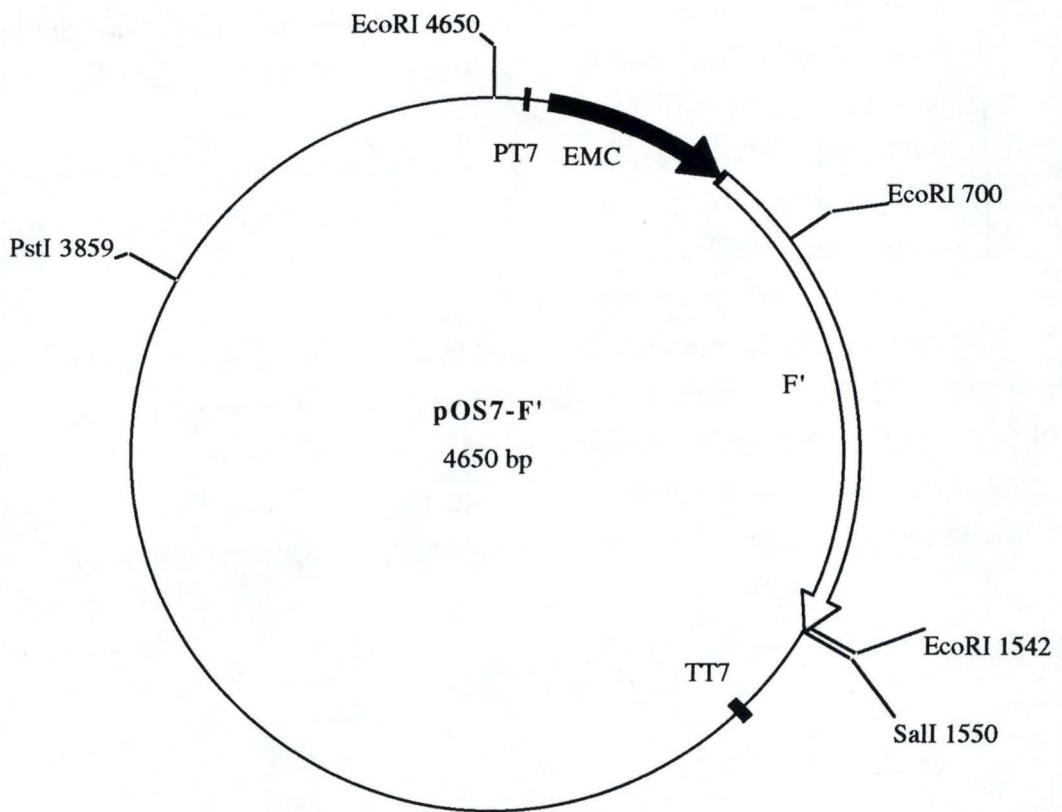


Figure 51 : Carte du plasmide pOSF' montrant les sites de restrictions *PstI*, *SalI* et *EcoRI*.

2.3.2. Expression transitoire en cellules eucaryotes.

Les fragments linéaires obtenus par PCR ont été employés en parallèle avec d'autres infections-transfections du plasmide pOS-F', les conditions restant les mêmes.

Aucun marquage en immunofluorescence sur cellules fixées n'était visible. La révélation par la technique du Dot blot du surnageant total n'a pas donné plus de résultats (cfr. pistes A2 et C2 de la figure 50).

Plusieurs explications quant à ces résultats peuvent être avancées. D'une part, ils pourraient être imputés à une moins bonne efficacité de la transfection linéaire mais aussi à un manque de stabilité de cette séquence. D'autre part, la seule séquence non présente sur ce fragment linéaire, par rapport aux séquence de pOS7, est le terminateur T7. Il reste à voir quelle pourrait être son implication dans la non expression. Afin de le vérifier, nous avons voulu déterminer l'expression de fragments linéaires du plasmide pOS-F' restreint par différents enzymes (cfr. figure 51) :

- Sal I coupe le plasmide juste en amont du terminateur. La non expression de la protéine F' devrait donc s'expliquer par l'absence de ce terminateur.
- Pst I coupe en amont du promoteur T7. La protéine F' devrait donc être exprimée puisque tous les éléments nécessaires à la transcription sont présents et que la taille reste identique à celle du plasmide. Si l'efficacité de transfection est faible ou que le brin d'ADN transfecté est instable, aucune expression ne sera détectée dans les cellules infectées-transfectées.
- Eco RI coupe le plasmide en trois fragments dont un contient tous les éléments nécessaires à la transcription sauf le terminateur. La localisation sur F' du "fragment issu de cette restriction ne peut contenir la séquence potentiellement reconnue par l'anticorps AK13A2 (Lopez *et al.*, 1993). Il constituera donc notre témoin négatif.

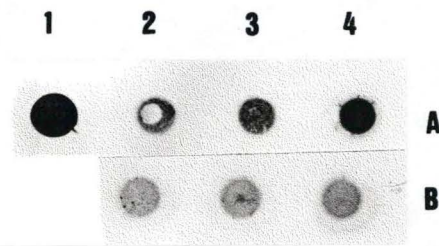


Figure 52 : Détection en Dot blot par l'anticorps AK13A2 de l'expression des fragments linéaires du plasmide pOSF' par les enzymes Pst1 (B2), Sal 1 (B3) et EcoR1 (B4). La piste A est un contrôle de l'expression transitoire (virus RSV : 1; Témoin cellulaire : 2; Infection-transfection par le plasmide pOS7 : 3; et Infection-transfection par le plasmide pOSF' : 4).

2.3.3. Expression de séquence linéaire du plasmide pOSF'.

En immunofluorescence ou en Dot blot, nous n'obtenons aucune détection spécifique de l'expression de la protéine F' (cfr. piste B2, B3 et B4 de la figure 52). Même s'il est difficile d'élaborer une hypothèse à ce stade puisqu'aucune expression n'est observée pour la séquence du plasmide pOS-F' restreinte par *Pst 1*. A ce stade, nous pouvons donc penser qu'une optimisation de la transfection de brins linéaires devrait pouvoir répondre à ces différents problèmes.

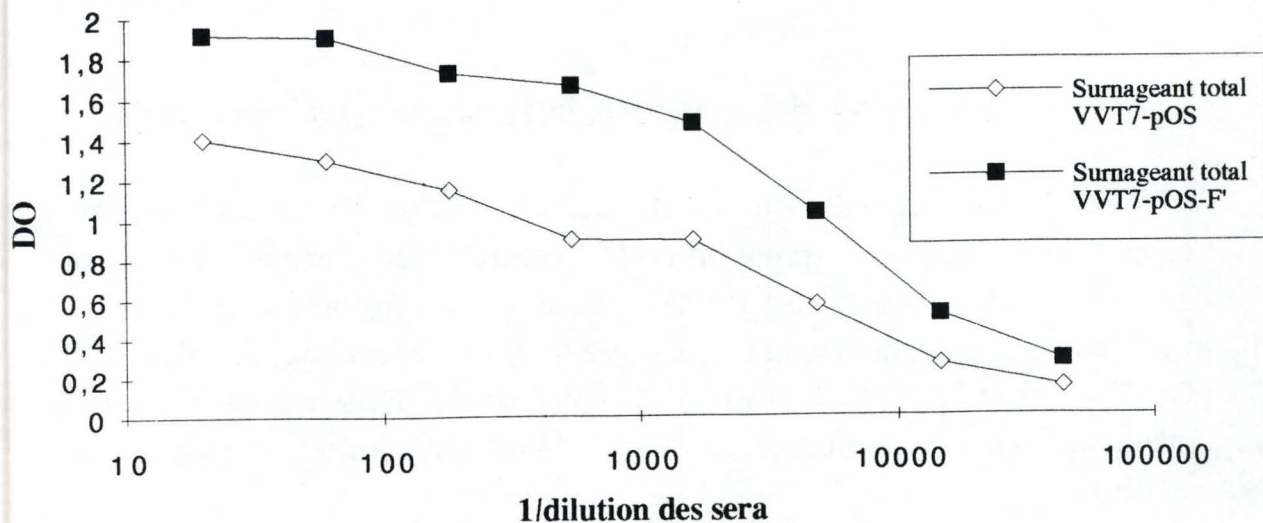


Figure 53 : Détection en ELISA de l'antigène viral (RB94) par des polysera issus de souris immunisées avec un lysat cellulaire (gel-degel) de cellules infectées-transfectées soit en présence du plasmide pOS7 (□) ou pOSF' (■).

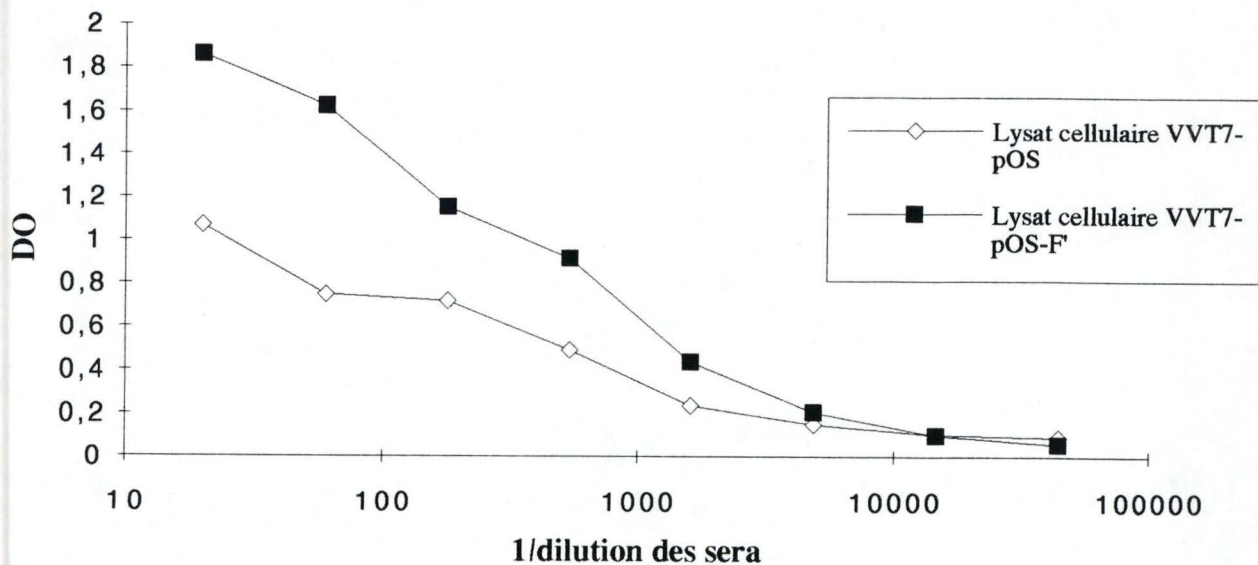


Figure 54 : Détection en ELISA de l'antigène viral (RB94) par des polysera issus de souris immunisées avec du surnageant total de cellules infectées-transfectées soit en présence du plasmide pOS7 (□) ou pOSF' (■).

3. Etude de l'immunogénicité de la protéine F' exprimée en système transitoire.

Après que la détection de la protéine F' exprimée en cellules eucaryotes par un anticorps spécifique de la protéine F du BRSV (AK13A2) aient été montrée, notre préoccupation a été d'analyser l'immunogénicité de cette protéine et d'estimer si le produit d'expression F' était capable d'induire une réponse spécifique du BRSV. Il était donc intéressant d'étudier la réponse immunitaire de souris immunisées à l'aide de la protéine F'.

Afin d'étudier la réponse immunitaire en présence de la protéine F', quatre groupes de trois souris ont été immunisées selon le schéma expérimental suivant :

- Un groupe contrôle négatif (1) avec des cellules infectées-transfectées par pOS7 et lysées par la méthode gel-dégel.
- Un groupe contrôle négatif (2) avec le surnageant total de cellules infectées-transfectées par pOS7.
- Un groupe (3) avec le lysat cellulaire de cellules infectées-transfectées par pOS-F'.
- Un groupe (4) avec le surnageant total de cellules infectées-transfectées par pOS-F.

Une quantité équivalente d'antigène par souris immunisée a été utilisée correspondant à approximativement un million de cellules. Quinze jours après la troisième immunisation, le sérum récolté a été testé par la technique ELISA sur le virus BRSV (RB94).

Les graphes (figures 53 et 54) expriment la moyenne des densités optiques (D.O.) de séra provenant des souris du même groupe en fonction de la dilution des séra. Une réponse spécifique a été observée pour les deux groupes de souris correspondant à l'expression de la protéine F' (groupes 3 et 4). Néanmoins, ces immunisations diffèrent quelques peu quand on les analyse de façon plus précise. En effet, si la "D.O.-plateau" se situe au même niveau pour les séra posF' (lysate cellulaire ou surnageant total), celle-ci

perdre jusqu'à des dilutions de 1/1620 pour les souris immunisées par le surnageant total alors qu'elle diminue dans les premières dilutions pour le lysat cellulaire.

Remarquons également une D.O. élevée pour les polyséras des souris immunisées comme contrôle négatif (groupes 1 et 2) (celle-ci étant même plus faible pour les lysats cellulaires).

Pour expliquer ces résultats, il faut toutefois se rappeler que nos solutions d'immunisations contiennent, outre l'antigène, de nombreux débris cellulaires de CV1 et de la Vaccine. Le RB 94 utilisé, et qui sert à "coater" les plaques ELISA, provient d'une culture de cellules VERO (singes) infectées par ce virus. La préparation du virus (gel-dégel et ultracentrifugation) ne permet pas d'éliminer totalement tous les antigènes cellulaires. Dans ces conditions, il est logique d'observer une réactivité croisée entre les polyséras et les antigènes cellulaires.

Discussion

Discussion.

Le rôle joué par le BRSV dans les pathologies respiratoires chez les individus dans les premiers mois de leur vie ainsi que les dépenses élevées imputées à cette maladie justifient la mise au point de moyens prophylactiques efficaces.

Parmi les dix protéines exprimées par le génome du RSV, la protéine de fusion (F) semble être la plus susceptible d'induire une réponse protectrice à l'encontre d'une infection par le BRSV. D'une part, celle-ci est fortement conservée. D'autre part, la majorité des anticorps protecteurs (neutralisants et inhibiteurs de fusion) sont dirigés contre la protéine F. Cependant, les phénomènes histopathologiques observés à la suite d'immunisation à l'aide de cette protéine semblent montrer que la protéine F serait responsable au moins en partie des phénomènes d'aggravation de la maladie (Belshe *et al.*; 1993; Wathen *et al.*, 1991; Connors *et al.*, 1992). Dans ce contexte, l'identification et la localisation des épitopes protecteurs sur cette protéine seraient des plus utiles.

Actuellement malgré le nombre important de groupes concernés par l'étude de ce problème et l'arsenal des techniques utilisées à cet effet, la localisation précise des sites reconnus par des anticorps neutralisants anti-protéine F s'est limitée à quatre épitopes (dont deux se chevauchent).

En outre, l'immunisation de souris avec de courtes séquences peptidiques recouvrant ces zones n'induit pas de réponse dirigée contre la protéine F.

Face à ces résultats, l'immunisation à l'aide de fragments protéiques plus longs paraît pertinente en vue d'induire une réponse protectrice .

Le but de ce travail a été l'expression de la protéine F au sein de cellules eucaryotes. Pour ce faire, nous avons choisi l'expression transitoire par un système d'infection-transfection. Le principe de ce système consiste à infecter des cellules eucaryotes par le virus de la Vaccine T7 (qui exprime la polymérase T7 dans le cytoplasme cellulaire) puis à transfecter ces mêmes cellules avec un plasmide contenant le gène d'intérêt sous dépendance d'un promoteur T7.

Dans la première partie de notre travail, les conditions optimales de transfection de cellules CV1 ont été mises au point à l'aide d'un plasmide exprimant le gène de la β -galactosidase. A cette fin, nous avons utilisé deux techniques différentes, à savoir la précipitation au phosphate de calcium et les lipides cationiques.

La précipitation au phosphate de calcium s'est avérée inefficace dans le cadre de ces tests. Ces résultats pourraient en partie être imputés à la mortalité cellulaire importante observée lors de ces tests (probablement suite à une toxicité due au processus de transfection). Un autre problème lié à cette technique concerne la quantité d'ADN requise pour permettre une entrée d'ADN dans les cellules. La littérature (Alexander *et al.*, 1992) montre en effet que cette technique requiert l'utilisation d'une quantité d'ADN élevée pour obtenir une transfection efficace quelque soit le type de cellules utilisées. Or, le plasmide pOS7 utilisé dans de travail est issu du plasmide pBR 322 dont le faible taux de réplication en bactérie ne permet pas une production d'ADN en grande quantité. Malgré l'utilisation de chloramphénicol en vue d'améliorer le rendement de la préparation d'ADN plasmidique, la quantité d'ADN extraite reste faible comparé à d'autres plasmides. Par conséquent, cette technique a été abandonnée dans la suite de ce travail.

La transfection des cellules CV1 à l'aide de lipides cationiques a également été envisagée.

Si la molécule de "Transfectam" (Promega) permet une faible expression du gène de la β galactosidase, l'efficacité de la lipofectine et de la lipofectamine sur la transfection de cellules CV1 semble néanmoins supérieure.

Ces résultats ne sont pas sans rappeler les données reprises dans la littérature à ce sujet. En effet, si plusieurs publication (Felgner *et al.*, 1987; Heminway *et al.*, 1994) montrent une transfection efficace de cellules CV1 à l'aide de la lipofectine et de la lipofectamine, aucune donnée quant à l'efficacité du transfectam sur ce type de cellules n'est disponible. A ce stade, il est difficile d'élaborer des hypothèses au sujet des différences observées entre ces lipides cationiques. Rappelons qu'aucune explication claire n'a été décrite quant au mécanisme de transfert de l'ADN dans les cellules à l'aide de lipides cationiques .

Enfin, il nous faut noter que l'efficacité de la lipofectamine semble supérieure à la lipofectine en transfection. Ceci pourrait être expliqué par le plus grand nombre de charges positives présentes sur la molécule de

lipofectamine. Dans ce cas, la fixation de l'ADN sur le lipide cationique pourrait en être améliorée.

La deuxième étape de notre travail a consisté en l'expression d'un fragment de la protéine F (F') dans le système d'infection-transfection transitoire en cellules eucaryotes. Pour ce faire, le gène F' a été introduit dans le vecteur pOS7. Après infection de cellules CV1 par la Vaccine T7, ce plasmide pOS-F' a été introduit dans les cellules en suivant les conditions préalablement définies. La détection du produit d'expression a été réalisée en immunofluorescence. Une mise au point des conditions optimales d'infection a également été réalisée, celles-ci correspondant à une infection de cellules CV1 à l'aide de 0,5 TCID₅₀ de Vaccine T7 pendant une heure.

Dès à présent, il faut remarquer que la quantité de particules virales préconisée par la littérature (Dong & Hunter, 1993; Blakely *et al.*, 1991; Yao *et al.*, 1993) est comprise entre 10 et 20 TCID₅₀. D'une part, nous avons montré que l'expression semble efficace en infectant à l'aide de 0,5 TCID₅₀. D'autre part, même avec cette faible quantité, la lyse des CV1 apparaît très importante. Cette lyse observée pourrait être liée à la présence excessive de protéines dans la solution de Vaccine T7 utilisée pour l'infection. En effet, le stock viral a été produit à partir d'une culture de cellules CV1 infectées par la Vaccine et lysées, cette préparation libérant un ensemble de protéines cellulaires dans le milieu. Le faible titre obtenu dans cette préparation n'autorise qu'une dilution limitée du stock si l'on veut ajouter un quantité de particules virales acceptable pour l'infection. Il pourrait en résulter une toxicité des différents composants de la préparation à l'encontre des cellules.

Vu l'absence en Dot-Blot de détection du produit d'expression de pOS-F' dans le lysat cellulaire (issu de cellules tapissant le fond du puits) et vu l'importance de lyse cellulaire résultant de l'infection-transfection, nous avons envisagé la possibilité d'obtenir une quantité supérieure de protéine F' dans le surnageant de culture. A cet égard, il a pu être montré que la majorité des protéines F' se trouvait bien dans ce surnageant.

Ce procédé nous a permis d'augmenter notablement le signal et ainsi de mettre en oeuvre d'autres techniques de détection. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'expression protéique par la technique de Western blot. Cette technique a permis d'estimer la taille de la protéine F' exprimée dans un système eucaryote. Si la taille évaluée de cette protéine est proche de celle

de la même protéine exprimée en bactérie, il est difficile d'estimer la glycosylation sur cette protéine sur base de ces résultats. Il nous faut en effet rappeler que la séquence F' exprimée comporte un site potentiel de glycosylation. L'expression en cellules eucaryotes de cette protéine devrait permettre l'incorporation de sucres au cours de sa maturation.

Enfin, ces résultats apparaissent comme novateur par rapport à ceux décrits dans la littérature en matière d'expression transitoire par le système d'infection-transfection. En effet, aucun auteur n'a pu prouver l'expression de la protéine-cible par la technique du Western blot.

Ce travail s'inscrivant dans le cadre de la localisation d'épitopes sur la protéine F, il serait intéressant d'appliquer cette méthodologie à d'autres anticorps. Cependant la majorité des anticorps anti-protéine F disponibles ne permet de détecter que faiblement la protéine F en Western Blot (à partir de lysats de cellules infectées par le BRSV). A ce titre, quelques modifications pourraient être apportées à la détection de la protéine F' (voir conclusions et perspectives) .

La suite de ce travail consistera à restreindre la zone reconnue par ces anticorps monoclonaux. C'est dans ce contexte que, le clonage de fragments plus courts du gène F dans pOS7 et leur expression pourraient être envisagés. Afin de contourner ces problèmes de clonage, nous avons évalué l'expression de fragments linéaires (contenant les séquences promotrices semblables à celles de pOS7 et amplifiés par les technique PCR) dans un système d'infection-transfection.

Les tests préliminaires réalisés au cours de ce travail n'ont pu mettre en évidence l'expression de fragments de la protéine F. A ce stade, plusieurs hypothèses pourraient être avancées. Les fragments étant sous forme de brins linéaires d'ADN, il est possible que l'efficacité de transfection ne puisse être comparée à un ADN circulaire (du type pOS7). De plus, ces fragments pourraient être plus instables (éventuellement plus vite dégradés) dans la cellules transfectées. Enfin, il nous faut rappeler que si la séquence promotrice est identique entre le plasmide pOS7 et les fragments linéaires, ces derniers ne disposent néanmoins pas de terminateur de transcription spécifique de la polymérase T7.

Afin d'éprouver ces quelques hypothèses, nous avons linéarisé le plasmide pOSF' à l'aide d'enzymes de restrictions (libérant différentes régions du

plasmide). L'expression de ces fragments dans le système Vaccine T7 n'a montré aucun résultat satisfaisant et ce, quelque soit le fragment utilisé.

Eu égard, à ces données, nous pouvons donc penser qu'une mise au point plus spécifique de la transfection constitue une étape préalable à l'étude de l'expression de fragments linéaires.

La localisation de sites de fixation d'anticorps monoclonaux protecteurs est très importante en soi, mais ne trouve d'intérêt que si une pertinence biologique de ces zones peut être établie. Dans ce cadre, il était intéressant d'évaluer l'immunogénicité du produit d'expression de pOS-F'. Pour ce faire, des souris ont été immunisées à l'aide de la protéine F'. Après trois immunisations, une réponse spécifique contre le virus a été démontrée. Néanmoins, la technique ELISA employée au cours de ce travail ainsi que la préparation antigénique utilisée ont laissé apparaître une réactivité croisée entre les polyséras (quelque soit le type de préparation de l'antigène servant à immuniser) et l'antigène de détection utilisé. Ceci peut être expliqué par la présence d'antigènes cellulaires à la fois dans la préparation antigénique servant à immuniser les souris, mais également au sein de l'antigène permettant d'analyser la spécificité des polyséras. Bien que quelques améliorations soit nécessaires (diminution du bruit de fond relatif à la réactivité polyséras sur les antigènes cellulaires), ces résultats montrent donc la pertinence d'immuniser des souris à l'aide de fragments plus longs en vue d'obtenir une réponse immunitaire efficace contre le RSV. Rappelons en effet que les immunisations réalisées à l'aide de courtes séquences peptidiques (recouvrant les sites de fixation des anticorps monoclonaux neutralisants anti-protéine F) n'ont pas permis jusqu'ici d'induire une réponse spécifique du virus (Lopez *et al.*, 1993).

Malgré les promesses engendrées par ces résultats, il reste néanmoins à estimer la capacité protectrice des polyséras induits par l'immunisation avec la protéine F'.

**Conclusions
et
perspectives**

Conclusions et perspectives.

Au cours de ce travail, nous avons exprimé transitoirement un fragment de la protéine de fusion du BRSV (F') par un système d'infection-transfection en cellules eucaryotes.

La première partie de notre travail a permis de mettre au point les conditions optimales de transfection de cellules CV1. Parmi les différentes méthodes testées (précipitation au phosphate de calcium, transfectam, lipofectine et lipofectamine), les lipides polycationiques de type lipofectamine ont été retenus pour leur efficacité supérieure de transfection. Une quantité de 7 μ l de lipofectamine en présence de 3 μ g d'ADN a été utilisée tout au long de ce travail.

Une deuxième étape a consisté à cloner le gène F' (correspondant à la partie codant pour la sous-unité F1) dans le vecteur d'expression pOS7.

L'expression transitoire en cellules eucaryotes de la protéine F' a été détectée, non seulement en immunofluorescence mais également en Dot blot et Western blot.

Ce travail s'inscrivant dans le cadre de la localisation plus globale d'épitopes protecteurs sur la protéine F du BRSV, il serait intéressant de tester d'autres Ac. Mon. sur le produit d'expression du gène F'. Dans ce contexte, il conviendrait d'utiliser les méthodologies d'expression et de détection développées au cours de ce travail. Il nous faut néanmoins souligner que la détection en Western blot se réalise sur des protéines notablement dénaturées. Or, la majorité des anticorps disponibles dans notre laboratoire ne reconnaissent que faiblement, voir pas du tout, la protéine F1 (sur un lysat de cellules infectées par du BRSV) en Western blot.

Pour contrecarrer cette limite de la technique, nous pourrions envisager d'autres types de détection du produit d'expression qui font appel à des conditions moins drastiques (tests ELISA, immunoprécipitations,...).

Outre le fait de tester tous les anticorps monoclonaux disponibles contre le fragment protéique F', il conviendrait dans un second temps d'analyser la réactivité de ces Ac. contre des fragments protéiques de plus en

plus courts et ce, afin de délimiter la zone importante pour la fixation de ceux-ci sur la protéine F.

Afin de restreindre la taille des fragments protéiques, nous pourrions procéder au clonage d'autres morceaux du gène dans le plasmide pOS7. Mais, le clonage à partir de fragments amplifiés par PCR (technique la plus simple pour obtenir des fragments d'ADN de tailles différentes et de séquences connues) est un procédé présentant parfois quelques difficultés. De plus, l'utilisation d'un plasmide qui a pour origine pBR 322 est difficilement envisageable dans le cadre d'une production d'ADN en grande quantité. Pour éviter ces problèmes, nous nous sommes tournés vers l'expression de fragments linéaires d'ADN (amplifiés par la technique PCR) contenant le gène d'intérêt sous dépendance du promoteur T7.

A ce jour, l'expression de fragments linéaires en cellules eucaryotes n'a pu être menée à son terme. Ces problèmes pourraient être liés à un transfert inefficace de l'ADN dans les cellules, mais également par une mauvaise expression du fragment considéré. Afin de confirmer ces hypothèses, nous avons étudié l'expression de fragments linéarisés (par restrictions enzymatiques) de pOS-F'. Aucune expression n'a été détectée.

A ce stade, ces résultats ne nous permettent pas d'avancer d'explication claire quant à l'inefficacité de la procédure envisagée. Néanmoins, à la lumière de cette étude, il est certain qu'une expression efficace de fragments linéaires ne peut s'envisager qu'après une mise au point plus spécifique des conditions de transfection inhérente à ces fragments

La localisation d'un épitope sur une protéine particulière n'a de réel intérêt que si l'on peut montrer que l'immunisation par un peptide recouvrant sa séquence peut protéger valablement contre une infection par le virus. Dans cette optique, nous avons immunisé des souris à l'aide du produit d'expression de la protéine F'. Les résultats obtenus dans un test ELISA à l'aide des polysera générés par cette immunisation indiquent que ceux-ci reconnaissent le BRSV.

Notons, toutefois que même les polysera de souris immunisées avec un lysat cellulaire témoin (cellules infectées avec la vaccine T7 et transfectées avec le plasmide non recombinant pOS7) présentent une réactivité non négligeable (bien que plus faible que pour le produit d'expression de pOS-F') avec l'Ag de détection .

Ces résultats peuvent être expliqués par la présence d'antigènes cellulaires (de même type) dans la "solution d'immunisation" et la préparation d'antigène viral utilisée pour la détection en ELISA. Afin d'éviter ces réactions croisées, nous pourrions procéder à une purification protéique par immunoaffinité (à l'aide d'Ac. Mon.) des Ag d'immunisation. Les polysera résultant de l'immunisation pourraient aussi être testés sur un antigène viral purifié. Rappelons néanmoins que cette technique de purification par immunoaffinité nécessite l'utilisation de conditions d'élutions assez drastiques (pH acide) qui pourraient dénaturer la protéine d'intérêt. Ceci pourrait conduire à la perte d'épitopes discontinus sur les protéines purifiées et ainsi diminuer notablement la réactivité des polysera en ELISA.

Si les polysera provenant de l'immunisation à l'aide de la protéine F' est spécifique du BRSV, il n'est pas certain que ceux-ci disposent également d'activités fonctionnelles (neutralisation *in vitro* de l'infection de cellules par le virus ou inhibition de fusion de cellules infectées). Or, de telles fonctions paraissent importantes en matière de protection (Taylor *et al.*, 1993). Dans ce contexte, des tests de neutralisation et d'inhibition de fusion *in vitro* à l'aide des polysera concernés pourraient générer des informations intéressantes. Enfin, il nous faudrait déterminer si ces polysera seraient capables d'empêcher la réplication virale *in vivo*. Ainsi, les souris immunisées pourraient subir un test "de résistance à l'infection" par le BRSV. L'évaluation de la protection serait réalisée par des tests d'isolement du virus dans les poumons de souris immunisées et infectées.

En conclusion, les résultats émanant de ce travail nous laissent croire que la technique d'expression transitoire développée semble très prometteuse dans l'optique de la localisation de certaines zones importantes pour la protection contre le BRSV.

Bibliographie

Bibliographie.

- Alexander, W.A., Moss, B. & Fuerst, T.R.** (1992) Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the *Escherichia coli lac* repressor, *J. Virol.*, 66, 2934-2942.
- Alwan, W.H., Kozłowska, W.J. & Openshaw, P.J.M.** (1994) Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells, *J. Exp. Med.*, 179, 81-89.
- Alwan, W.H., Record, F.M. & Openshaw, J.M.** (1992) CD4⁺ T cells clear virus but augment disease in mice infected with respiratory syncytial virus. Comparison with the effects of CD8⁺ T cells, *Clin. Exp. Immunol.*, 8, 527-536.
- Anderson, J.J., Norden, J., Saunders, D., Toms, G.L. & Scott, R.** (1990) Analysis of the local and systemic immune responses induced in BALB/c mice by experimental respiratory syncytial virus infection, *J. Gen. Virol.*, 71, 1561-1570.
- Arbiza, J., Taylor, G., López, J.A., Furze, J., Wyld, S., Whyte, P., Stott, E.J., Wertz, G., Sullender, W., Trudel, M. & Melero, 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.
- Baker, J.C. & Velicer, L.F.** (1991) Bovine respiratory syncytial virus vaccination : current status and future vaccine development, *The Compendium North American Edition*, 13, 1323-1332.
- Barik, S.** (1993) The structure of 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA, *J. Gen. Virol.*, 74, 485-490.
- Beeler, J.A. & van Wyke Coelingh, K** (1989) Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus : effect of mutation upon fusion function, *J. Virol.*, 63, 2941-2950.
- Belshe, R.B., Anderson, E.L. & Walsh, E.E.** (1993) Immunogenicity of purified F glycoprotein of respiratory syncytial virus : clinical and immune responses to subsequent natural infection in children, *J. Infect. Dis.*, 168, 1024-1029.
- Blakely, R.D., Clark, J.A., Rudnick, G. & Amara, S.G.** (1991) Vaccinia-T7 RNA polymerase expression system : evaluation for the expression cloning of plasma membrane transporters, *Ann. Biochem.*, 194, 302-308.
- Ciccarone, V., Hawley-Nelson, P., Jessee, J.** (1993) Cationic liposome-mediated transfection : effect of serum on expression and efficiency, *Focus*, 15, 80-83.

- Collins, P.L. (1990) O glycosylation of glycoprotein G of human respiratory syncytial virus is specified within the divergent ectodomain, *J. Virol.*, 64, 4007-4012.
- 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.
- Connors, M., Collins, P.L., Firestone, C.-Y., Sotnikov, A.V., Waitze, A., Davis, A.R., Hung, P.P., Chanock, R.M. & Murphy, B.R. (1992a) Cotton rats previously immunized with a chimeric RSV FG glycoprotein develop enhanced pulmonary pathology when infected with RSV, a phenomenon not encountered following immunization with vaccinia-RSV recombinants or RSV, *Vaccine*, 10, 475-484.
- Connors, M., Kulkarni, A.B., Collins, P.L., Firestone, C.-Y., Holmes, K.L., Morse III, H.C. & Murphy, B.R. (1992b) Resistance to respiratory syncytial virus (RSV) challenge induced by infection with a vaccinia virus recombinant expressing the RSV M2 protein (Vac-M2) is mediated by CD8⁺ T cells, while that induced by Vac-F or Vac-G recombinants is mediated by antibodies, *J. Virol.*, 66, 1277-1281.
- Dong, J. & Hunter, E. (1993) Analysis of retroviral assembly using a vaccinia/T7-polymerase complementation system, *Virology*, 194, 192-199.
- Elroy-Stein, O. & Moss, B. (1990) Cytoplasmic expression system based on constitutive synthesis of bacteriophage T7 RNA polymerase in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6743-6747.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. & Danielsen, M. (1987) Lipofectin : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413-7417.
- García-Barreno, B., Palomo, C., Penas, C., Delgado, T., Perez-Brena, P. & Melero, J.A. (1989) Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins, *J. Virol.*, 6, a-h.
- Geysen, H.M., Rodda, S.J., Mason, T.J., Tribbick, G. & Choofs, P.G. (1987) Strategies for epitope analysis using peptide synthesis, *J. Immunol. Methods*, 102, 259-274.
- Graham, B.S., Bunton, L.A., Wright, P.F. & Karzon, D.T. (1991) Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice, *J. Clin. Invest.*, 88, 1026-1033.

- Greenspan, N.S.** (1992) Epitopes, paratopes and other topes : do immunologists know what they are talking about, *Bull. Inst. Pasteur*, 90, 267-279.
- Hall, C.B.** (1994) Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine, *Science*, 265, 1393-1394.
- Hall, C.B., Walsh, E.E., Long, C.E. & Schnabel, K.C.** (1991) Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus, *J. Infect. Dis.*, 163, 693-698.
- Hawley-Nelson, P., Ciccarone, V., Gebeyehu, G. & Jessee, J.** (1993) Lipofectamine reagent : a new, higher efficiency polycationic liposome transfection reagent, *Focus*, 15, 73-80.
- Heminway, B.R., Yu, Y., Tanaka, Y., Perrine, K.G., Gustafson, E., Bernstein, J.M. & Galinski, M.S.** (1994) Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion, *Virology*, 200, 801-805.
- Huang, Y.T. & Wertz, G.W.** (1983) Respiratory syncytial virus mRNA coding assignments, *J. Virol.*, 46, 667-672.
- Kimman, T.G. & Westenbrink, F.** (1990) Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus, *Arch. Virol.*, 112, 1-25.
- Kimman, T.G., Westenbrink, F. & Straver, P.J.** (1989) Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus : effect of amount of virus replication, route of administration and maternal antibodies, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 22, 145-160.
- Kuzel, R.J. & Clutter, D.J.** (1993) Current perspectives on respiratory syncytial virus infection, *Postgraduate Medicine*, 93, 129-141.
- La Via, W.V., Marks, M.I. & Stutman, H.R.** (1992) Respiratory syncytial virus puzzle : clinical features, pathophysiology, treatment, and prevention, *J. Pediatr.*, 121, 503-509.
- López, J.A., Andreu, D., Carreño, C., Whyte, P., Taylor, G. & Melero, J.A.** (1993) Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein, *J. Gen. Virol.*, 74, 2567-2577.
- Lounsbach, G.R., Bourgeois, C., West, W.H.L., Robinson, J.W., Carter, M.J. & Toms, G.L.** (1993) Binding of neutralizing monoclonal antibodies to regions of the fusion protein of respiratory syncytial virus expressed in *Escherichia coli*, *J. Gen. Virol.*, 74, 2559, 2565.
- Maniatis, T. Fritsch, E.F. & Sambrook, J.** (1989) *In* : Molecular cloning, a laboratory manual (2nd Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Martin-Gallardo, A., Fien, K.A., Hu, B.T., Farley, J.F., Seid, R., Collins, P.L., Hildreth, S.W. & Paradiso, P.R.** (1991) Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in *Escherichia coli* : mapping of a fusion inhibiting epitope, *Virology*, 184, 428-432.
- McIntosh, K. & Chanock, R.M.** (1990) Respiratory syncytial virus, *In* : *Virology* (second edition), Fields, B.N. & Knipe, D.M. (eds.), Raven Press, New York, 1, 1045-1072.
- Mizukami, T., Fuerst, T.R., Berger, E.A. & Moss, B.** (1988) Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV-blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9273-9277.
- Morris, J.A., Blount, R.E. & Savage, R.E.** (1956) Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92, 544-550.
- Moss, B.** (1990) Poxviridae and their replication, *In* : *Virology* (second edition), Fields, B.N. & Knipe, D.M. (eds.), Raven Press, New York, 2, 2079-2111.
- Moss, B., Elroy-Stein, O., Mizukami, T., Alexander, W.A. & Fuerst, T.R.** (1990) New mammalian expression vectors, *Nature*, 348, 91-92.
- Mufson, M.A., Örvell, C., Rafnar, B. & Norrby, E.** (1985) Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus, *J. Gen. Virol.*, 66, 2111-2124.
- Murphy, B.R., Prince, G.A., Collins, P.L., Hildreth, S.W. & Paradiso, P.R.** (1990) Effect of passive antibody on the immune response of cotton rats to purified F and G glycoproteins of respiratory syncytial virus (RSV), *Vaccine*, 9, 186-189.
- Paccaud, M.R. & Jacquier, C.A.** (1970) A respiratory syncytial virus of bovine origin, *Arch. Ges. Virusforsch.*, 30, 327-342.
- Paradiso, P.R., Hu, B.T., Arumugham, R. & Hildreth, S.** (1991) Mapping of a fusion related epitope of the respiratory syncytial virus fusion protein, *Vaccine*, 9, 231-237.
- Piedra, P.A., Wyde, P.R., Castleman, W.L., Ambrose, M.W., Jewell, A.M., Speelman, D.J. & Hildreth, S.W.** (1993) Enhanced pulmonary pathology associated with the use of formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine in cotton rats is not a unique viral phenomenon, *Vaccine*, 11, 1415-1423.

- Roberts, S.R., Lichtenstein, D., Ball, L.A. & Wertz, G.W. (1993)** Secreted and anchored forms of the attachment protein of respiratory syncytial virus are synthesized from different translational initiation sites (on the same mRNA), *Communication au 9ème congrès de virologie à Glasgow*.
- Routledge, E.G., Willcocks, M.M., Morgan, L., Samson, A.C.R., Scott, R. & Toms, G.L. (1987)** Expression of the respiratory syncytial virus 22K protein on the surface of infected HeLa cells, *J. Gen. Virol.*, **68**, 1217-1222.
- Schauder, B., Blöcker, Frank, R. & McCarthy, J.E.G. (1987)** Inducible expression vectors incorporating the *Escherichia coli atpE* translational initiation region, *Gene*, **52**, 279-283.
- Sommerfelt, M.A., Rhee, S.S. & Hunter, E. (1992)** Importance of p12 protein in Mason-Pfizer monkey virus assembly and infectivity, *J. Virol.*, **66**, 7005-7011.
- Stott, E.J., Taylor, G., Ball, L.A., Anderson, K., Young, K.K.-Y., King, A.M.Q. & 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. Virol.*, **61**, 3855-3861.
- Suzuki, D.T., Griffiths, A.J.F., Miller, J.H. & Lewontin, R.C. (1991)** *In* : Introduction à l'analyse génétique, De Boeck-Wesmael, Bruxelles.
- Taylor, G., Stott, E.J., Bew, M., Fernie, B.F., Cote, P.J., Collins, A.P., Hughes, M., Jebbett, J. (1984)** Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice, *Immunology*, **52**, 137-142.
- Taylor, G., Stott, E.J., Furze, J. & Sopp, P. (1992)** Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies, *J. Gen. Virol.*, **73**, 2217-2223.
- Taylor, J.A., Meyer, J.C., Legge, M.A., O'Brien, J.A., Street, J.E., Lord, V.J., Bergmann, C.C. & Bellamy, A.R. (1992)** Transient expression and mutational analysis of the rotavirus intracellular receptor : the C-terminal methionine residue is essential for ligand binding, *J. Virol.*, **66**, 3566-3572.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
- Vaux-Perez, F., Chapsal, J.-M. & Meignier, B. (1992)** Comparison of the ability of formalin-inactivated respiratory syncytial virus, immunopurified F, G, and N proteins and cell lysate to enhance pulmonary changes in Balb/c mice, *Vaccine*, **10**, 113-118.

- Vennema, H., Rijnbrand, R., Heijnen, L., Horzinek, M.C. & Spaan, W.J.M. (1991) Enhancement of the vaccinia virus/phage T7 RNA polymerase expression system using encephalomyocarditis virus 5'-untranslated region sequences, *Gene*, 108, 201-210.
- Villanueva, N., Navarro, J., Méndez, E. & García-Albert, I. (1994) Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein, *J. Gen. Virol.*, 75, 555-565.
- Walravens, K., Kettmann, R., Collard, A., Coppe, P. & Burny, A. (1990) Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses, *J. Gen. Virol.*, 71, 3009-3014.
- Wathen, M.W., Kakuk, T.J., Brideau, R.J., Hausknecht, E.C., Cole, S.L. & Zaya, R.M. (1991) Vaccination of cotton rats with a chimeric FG glycoprotein of human respiratory syncytial virus induces minimal pulmonary pathology on challenge, *J. Infect. Dis.*, 163, 477-482
- Wellems, G. & Leunen, J. (1975) Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires des bovins, *Ann. Méd. Vét.*, 119, 359-369.
- Wellems, G., Leunen, J. & Luchsinger, H. (1970) Isolement d'un virus (220/69) sérologiquement semblable au virus respiratoire syncytial humain, *Ann. Med. Vet.*, 114, 89-93.
- Wertz, G.W., Krieger, M. & Ball, L.A. (1989) Structure 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.
- Westenbrink, 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.
- Yao, Z., Jackson, W., Forghani, B. & Grose, C. (1993) Varicella-zoster virus glycoprotein gpl/gpIV receptor : expression, complex formation, and antigenicity within the vaccinia virus-T7 RNA polymerase transfection system, *J. Virol.*, 67, 305-314.