## MÉLANIE WELMAN

# SÉQUENÇAGE DU GÈNE DE LA PROTÉINE DE LA MATRICE DU VIRUS INFLUENZA PORCIN ET EXPRESSION DE LA PROTÉINE M1 RECOMBINANTE.

### Mémoire

présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation:

Jit Arora Ph.D.
Jean-François Laliberté Ph.D
Jean-Pierre Perrault Ph.D

Mai 1999 INRS-Institut Armand-Frappier Université du Québec

A mes parents que j'aime beaucoup

## Table des matières

Table des matières	iii
Liste des tableaux	
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	ix
Sommaire	xiii
1. Introduction	1
2. Revue bibliographique	6
2.1 Caractéristiques générales du virus influenza	7
2.1.1 Taxonomie	
2.1.2 Propriétés physico-chimiques	
2.1.3 Morphologie	
2.1.4 Protéines	
2.1.5 Cycle de réplication du virus	
2.2 Protéine de la matrice	
2.3 Protéine M1	
2.3.1 Caractéristiques générales	
2.3.2 Structures	
2.3.3 Sites antigéniques	
2.3.4 Fonctions	
2.3.5 Réponse immunitaire	
2.4 Protéine M2	
2.4.1 Caractéristiques générales	
2.4.2 Structure	
2.4.3 Sites antigéniques	
2.4.4 Fonctions	
2.4.5 Réponse immunitaire	
2.5 Le virus influenza et le porc	
2.5.1 Différents sous-types répertoriés	
2.5.2 Hôte intermédiaire	
2.5.3 Stabilité antigénique du virus influenza porcin	
2.6 Souches retrouvées au Québec	
2.6.1 A/Sw/Québec/192/81	
2.6.2 A/Sw/Québec/5393/91	
2.7 L'immunité	
2.8 Protéines recombinantes	
2.8.1 Système d'expression procaryote	
2.8.2 Système d'expression eucaryote	

	2.9 Vaccins	.33
	2.9.1 Vaccins sous-unitaires	
	2.9.2 Virus vivant atténué	.34
	2.9.3 Vecteurs viraux	.35
	2.9.4 Peptides synthétiques	. 36
	2.9.5 Acides nucléiques	
3	Approche expérimentale	. 39
	3.1 Virus	
	3.2 Souches virales	
	3.3 Culture et purification des souches virales	. 40
	3.3.1 Culture	
	3.3.2 Purification	
	3.4 Titre de l'activité hémagglutinante	. 42
	3.5 Dosage protéique	
	3.6 Analyse de la pureté de chaque souche virale purifiée	. 43
	3.7 Extraction de l'acide ribonucléique (ARNv) pour chaque souche	
	3.7.1 À partir du virus purifié	
	3.7.2 À partir du liquide allantoïque	. 45
	3.8 Synthèse et amplification du gène codant pour la protéine de la matrice, pour chaque souche virale	ır
	3.8.1 Amorces oligonucléotidiques	
	3.8.2 Réaction de transcription inverse	
	3.8.3 Amplification par PCR de la protéine de la matrice	
	3.9 Clonage du gène de la protéine de la matrice pour les souches virales SwQc8	
	et SwQc91	
	3.9.1 Purification des produits d'amplification	
	3.9.2 Clonage du gène de la protéine de la matrice	
	3.9.3 Transformation dans les bactéries compétentes InvaF	
	3.9.4 Criblage des colonies possédant le plasmide et l'insert	
	3.10 Séquençage	
	3.11 Sous-clonage de la protéine de la matrice dans le vecteur d'expression	
	pET21(a)	
	3.11.1 Digestion et purification de l'insert et du vecteur	
	3.11.2 Clonage du fragment M91 dans le vecteur pET21(a)	
	3.11.3 Transformation dans les bactéries compétentes E. coli BL-21(DE3)	
	3.11.4 Sélection des colonies exprimant la protéine M1 recombinante	
	3.11.5 Solubilisation des corps d'inclusion des bactéries BL-21(DE3)	
	3.11.6 Cinétique d'expression	
	3.12 Électroélution et dialyse de la protéine M1 recombinante	
	3.12.1 Production de la protéine M1 recombinante	
	3.12.2 Électroélution et dialyse	.57
	3.13 Purification de la protéine M1 native	
	3.14 Étude de l'antigénicité de la protéine M1 recombinante	
	3.14.1 Transfert électrophorétique	
	3.14.2 Immunobuvardage	
	3.15 Immunisation des souris	.61

3.16 Test ÉLISA indirect	62
4. Résultats	64
4.1 Purification et concentration	
4.2 Profil polypeptidiques des souches virales purifiées par SDS-PAGE	
4.3 Extraction de l'acide ribonucléique viral (ARNv)	
4.4 Réaction de transcription inverse et d'amplification par polymérisation en	
chaîne (PCR) de l'ADNc	68
4.5 Clonage du gène de la protéine de la matrice	
4.6 Séquençage	68
4.7 Expression de la protéine M1 de la souche SwQc91	83
4.8 Solubilisation de la protéine M1 recombinante	83
4.9 Conditions optimales d'expression de la protéine M1 recombinante	
4.10 Électroélution de la protéine M1 recombinante	
4.11 Réaction de la protéine M1 recombinante contre un sérum polyclonal anti-	
SwQc91	99
4.12 Vérification de l'intégrité des quatre épitopes de la protéine M1	
recombinante	
4.13 Évaluation de l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante 1	06
5. Discussion	10
6. Conclusion1	22
Remerciements1	25
Bibliographie1	27
Annexes	45
Annexe I: Préparation des tampons et des solutions	
Annexe II: Méthodes de quantification	
Annexe III: Liste des abréviations des acides aminés (aa)	
Annexe IV: Présentation	
Annexe V: Images digitalisées	

## Liste des tableaux

	Page
Tableau I: Changements observés dans les séquences d'aa entre les protéines M1 et M2 des souches SwQc81 et SwQc91 et évaluation du taux de mutation, exprimé en pourcentage de variation, pour les protéines M1 et M2 de la souche SwQc91.	81
Tableau II: Évaluation du taux de mutation, exprimé en pourcentage de variation, pour les protéines M1 et M2	

Tableau II: Evaluation du taux de mutation, exprimé en pourcentage de variation, pour les protéines M1 et M2 des souches SwQc81 et SwQc91, en comparant les changements en aa observés par résidu par année avec les séquences en aa des protéines M1 et M2 de d'autres souches d'influenza porcin (H1N1) (# accession du Genebank: M63517-M63520, M63522, M63525, M63532, M63534, M63535, M33045), isolées entre 1930 et 1990.

82

# Liste des figures

	Page
Figure 1: Représentation schématique du virus influenza.	9
Figure 2: Représentation schématique du segment 7 de l'ARN viral, codant pour les protéines M1, M2 et M3, ainsi que du canal ionique de la protéine M2.	18
Figure 3: Analyse de la pureté des souches SwQc81 et SwQc91 par électrophorèse sur SDS-PAGE, en conditions réductrices.	67
Figure 4: Électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplicon d'ADN du gène de la protéine de la matrice (M) produit par RT-PCR pour les souches porcines SwQc81 et SwQc91.	70
Figure 5: Profil électrophorétique des plasmides recombinants pCR 2.1/M extraits, pour la souche SwQc81 et SwQc91, des cellules compétentes INV <sub>α</sub> F suite à leur digestion avec l'enzy me de restriction EcoRI.	72
Figure 6: Étude comparative des séquences nucléotidiques des inserts d'ADNc de la protéine M, extraits de six colonies recombinantes et ce pour les souches virales SwQc81 et SwQc91, avec une séquence du gène de la protéine M provenant de la souche porcine A/Sw/Iowa/17672/88 (FLAM SI88).	74
Figure 7: Analy se comparative des séquences en aa de la protéine M1 des souches virales SwQc81 et SwQc91.	78
Figure 8: Les séquences en aa, représentant la protéine M2 de chaque souche virale provenant des clones C13, C45 et C47 (SwQc81) et des clones C5, C11 et C17 (SwQc91), ont été comparées avec la séquence publiée de la souche FLAMSI88 (#accession Genebank: M63522) pour la même protéine. Dans la figure, seule la séquence du gène de la protéine M de la souche porcine FLAMSI88 a été décrite sur toute sa longueur alors que pour les autres séquences seulement les différences ont été notées.	80
Figure 9: Profil électrophorétique, suite à une induction, des bactéries compétentes transformées avec les plasmides recombinants	
pET21/M.	85

	Page
Figure 10: Profil électrophorétique représentant les fractions recueillies du culot et du surnageant, suite à une sonication des suspensions contenant les bactéries recombinantes exprimant la protéine M1 recombinante (PMR).	87
Firm 11 Tokament in France Hellington J. CDC -Co. J. 12 (co.	
Figure 11: Traitement impliquant l'utilisation de SDS afin de libérer une plus grande quantité de PMR des corps d'inclusion de la bactérie <i>E. coli</i> , BL21(DE3).	89
Figure 12: Détermination des conditions optimales de production de la PMR dans les cellules compétentes d' <i>E.coli</i> , BL21(DE3), transformées avec le plasmide recombinant pET21/M en fonction de la température et de la quantité d'IPTG utilisée lors de l'induction.	92
Figure 13: Cinétique d'expression de la PMR produite dans les cellules compétentes d' <i>E.coli</i> , BL 21(DE3), transformées avec le plasmide recombinant pET21/M, en fonction du temps d'induction, selon une quantité d'IPTG et une	
température optimales préalablement déterminées.	95
Figure 14: Électroélution de la PMR et vérification de la pureté à l'aide	
d'un gel SDS-PAGE, en conditions réductrices.	98
Figure 15: Analy se de la réactivité antigénique de la PMR à l'aide d'un sérum polyclonal anti-SwQc91 par la méthode d'immunobuvardage.	
d mindiobuvaidage.	101
Figure 16: Étude sur l'intégrité des quatre épitopes de la PMR par de leur réactivité avec 5 AcMo à l'aide de la méthode d'immunobuvardage.	103
Figure 17: Évaluation du titre des anticorps, détectés dans le sérum de	
souris Balb/c immunisées avec quatre groupes d'échantillons, à l'aide d'un test ÉLISA indirect.	108

### Liste des abréviations

2xYT milieu bactérien composé de tryptone,

extrait de levure et NaCl

4CN 4-chloro-1-naphtol

aa acide aminé

Ac anticorps

AcMo anticorps monoclonal

ADN acide désoxyribonucléique

ADNc acide désoxyribonucléique complémentaire

Ag antigène

ARN acide ribonucléique

ARNv acide ribonucléique viral

ATP adénosine triphosphate

ß Bêta

BCA acide bicinchoninique

BSA albumine de sérum bovin

°C degré Celcius

cc centimètre cube

cm centimètre

CTL lymphocytes T cytotoxiques

DEPC diéthylpyrocarbonate

dNTP deoxynucléotides triphosphates

DO densité optique

DTT dithiothréitol

EDTA Éthylènediamine tétraacétique acide

ELISA Enzyme linked immunosorbent assay

g force gravitationnelle

g gramme

HA hémagglutinine

IHA inhibition d'hémagglutination

IPTG isopropyl- $\alpha$ -D-thiogalactopyranoside

Kb kilobase

kDa kilodalton

kg kilogramme

lbs/po2 livre par pouce carré

μg microgramme

μl microlitre

μm micromètre

μM micromolaire

M molaire

M1 partie interne de la protéine de la matrice

M2 partie externe de la protéine de la matrice

MDCK cellule de rein de chien "Madin Darby

Canine Kidney"

mg milligramme

ml millilitre

mM millimolaire

NA neuraminidase

ng nanogramme

NK natural killer cell

nanomètre nm

NP nucléoprotéine

OPD hypochlorure d'orthophénylène diamine

p/p poids par poids

p/v poids par volume

polymérase acide PA

taille du fragment nucléique en paire de pb

bases

PB1 polymérase basique 1

PB2 polymérase basique 2

**PBS** solution saline phosphatée

**PCR** réaction de polymérisation en chaîne

**PMNL** leucocytes polymorphonucléaires

**PMSF** phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride

PPN pneumonie proliférative et nécrosante

rotation par minute r.p.m.

**RNP** ribonucléoprotéine

RT transcription inverse

coefficient de sédimentation S

SDS-PAGE électrophorèse sur gel de polyacrylamide

en présence de sodium dodecyl sulfate

SRRP Virus du syndrome reproducteur et

respiratoire porcin

STET saccharose, Triton X-100, EDTA et Tris-

HC1

SwQc81 A/Sw/Québec/192/81

SwQc91 A/Sw/Québec/5393/91

TBS tampon Tris et NaCl

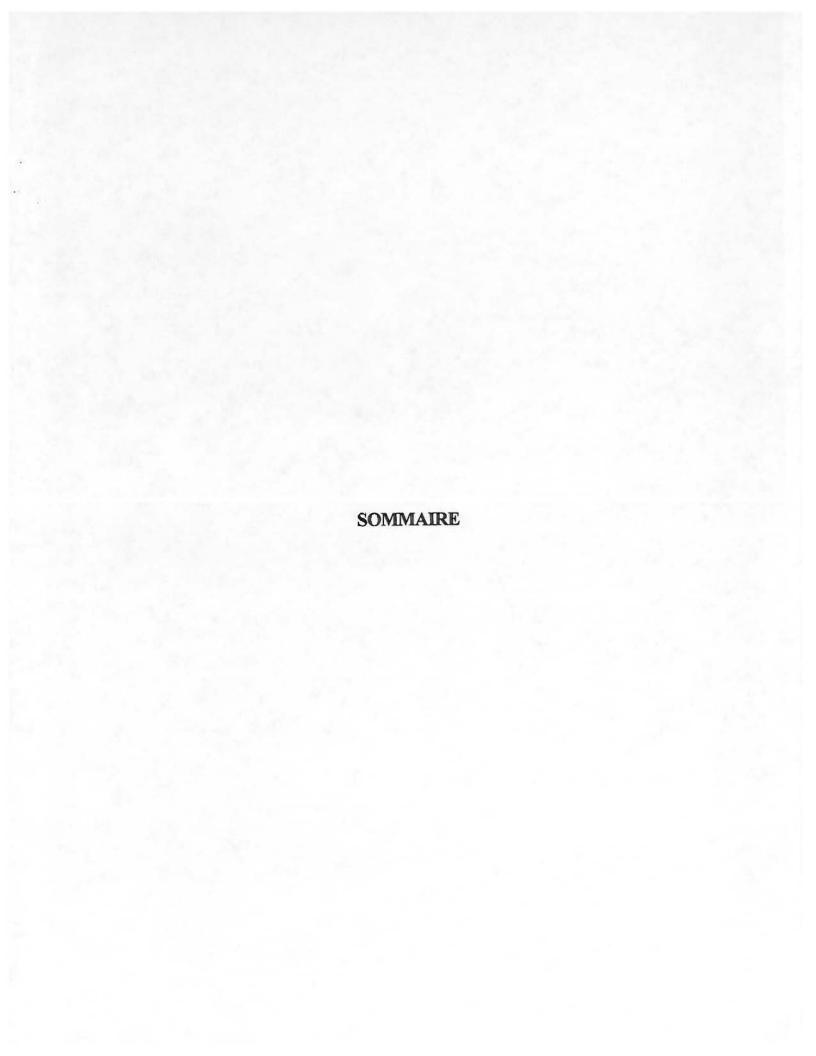
U unité

UHA unité hémagglutinante

UV ultraviolet

V volt

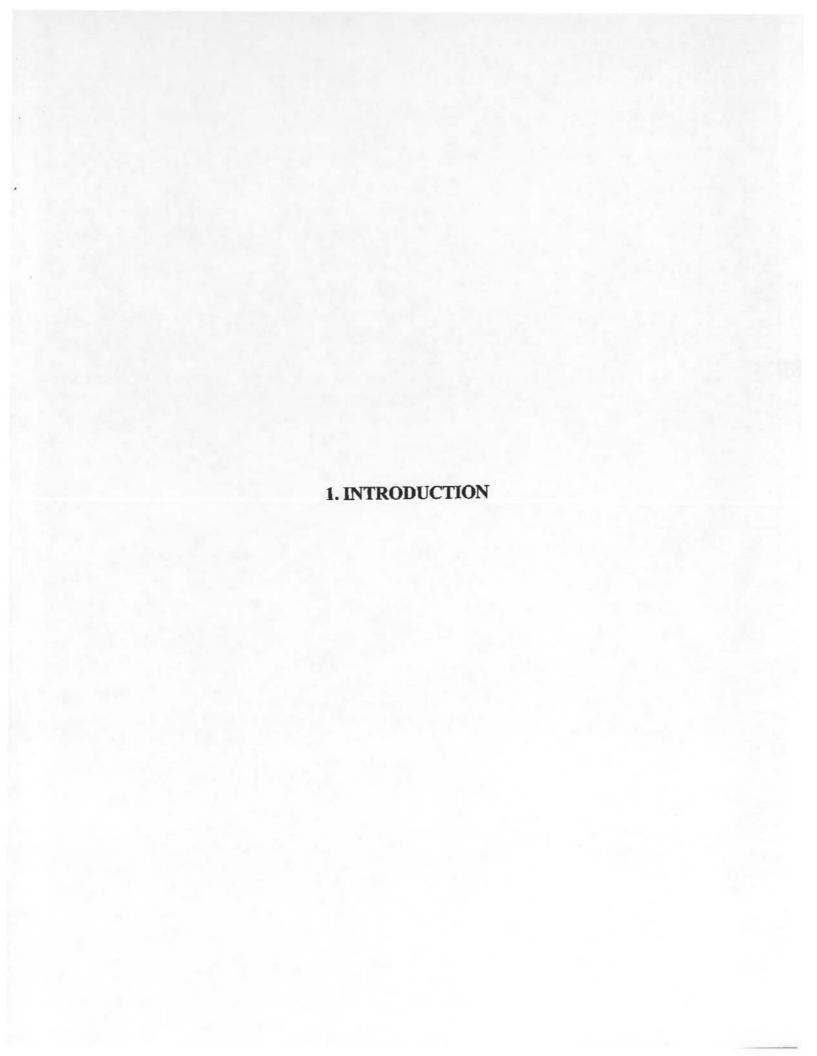
v/v volume par volume



Une étude réalisée avec la protéine de la matrice (M) d'un variant antigénique d'influenza porcin (H1N1), nommé A/Sw/Québec/5393/91 (SwQc91), associé à la pneumonie proliférative et nécrosante a été effectuée. Les séquences nucléotidiques et en acides aminés (aa) obtenues pour les protéines M1 et M2, codées par le gène de la protéine M, du variant SwQc91, ont permis de comparer les changements génomiques internes associés à la protéine M1 et externes, associés à la protéine M2, observés pour SwQc91 comparativement à une souche classique d'influenza porcin nommée A/Sw/Québec/192/81 (SwQc81). Des études portant sur l'expression de la protéine M1 dans le vecteur procary ote pET21(a), sur l'antigénicité ainsi que sur l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante (PMR) ont également été effectuées.

L'étude génomique a permis de constater que la protéine M1 a un taux de mutation de 0,08% alors que la protéine M2 a un taux de 0,51% ce qui est comparable à la protéine la plus variable du virus; la protéine hémagglutinine (HA) (0,4%-0,48%). La production de la PMR dans le vecteur pET21(a) a permis d'obtenir une protéine, présente en partie dans les corps d'inclusion de la bactérie BL-21(DE3), ayant une masse moléculaire (Mr) de 28 kDa. De plus, une quantité maximale de PMR a pu être obtenue en induisant la suspension bactérienne à 37°C avec 1 mM d'isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) pendant 12 heures et le rendement obtenu, suite à la purification et à la concentration de la PMR, a été évalué à 2,5 mg/ml par 200 ml de suspension bactérienne. L'étude portant sur l'antigénicité semble démontrer la stabilité de la PMR ainsi que l'intégrité de ses 4 épitopes, même après traitement avec du SDS. La PMR semble être un bon immunogène puisque des titres élevés en anticorps (Ac) anti-PMR (64 000) lorsque le virus était utilisé comme antigène (Ag) et 256 000 lorsque la PMR était utilisée comme Ag ont été détectés par ÉLISA indirect. Cette expérience démontre également la grande sensibilité de la PMR comme Ag puisqu'en utilisant une concentration de 1 μg/ml, il a été possible de détecter rapidement des titres élevés en Ac.

Melanie Weicmon



Le virus influenza, communément appelé virus de la grippe, cause une maladie des voies respiratoires qui est très contagieuse. À cause de sa virulence et de son instabilité antigénique, le virus influenza de type A est à l'origine de plusieurs épidémies plus ou moins sévères (Webster et al., 1982) ainsi que d'une pandémie importante; la grippe espagnole de 1918 responsable de la mort d'environ 30 millions de personnes (Pennisi, 1997; Taubenberger et al., 1997). Les sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 associés au virus influenza de type A sont les plus répandus chez l'homme et sont par conséquent responsables des infections grippales qui affectent ce dernier. Plus récemment, en décembre 1997, le virus a fait une fois de plus la démonstration de sa grande variabilité avec l'apparition à Hong Kong d'un nouveau sous-type (H5N1) responsable de la grippe du poulet (Cohen, 1997). Ce sous-type foumissait une preuve concrète de la transmission directe du virus d'un animal à l'homme, puisque seules les personnes ayant été en contact avec les poulets infectés ont été malades (Cohen, 1997). Ceci met en évidence l'importance de la surveillance de l'évolution du virus autant chez les animaux que chez l'homme (Webster et al., 1992).

L'influenza de type A est non seulement le plus pathogène et le plus répandu chez l'homme, il est également le plus fréquemment isolé chez d'autres types de mammifères (Hinshaw et al., 1978) ainsi que chez plusieurs espèces aviaires, notamment le canard qui est un vecteur naturel du virus (Slemons et al., 1978; Webster et al., 1992; Suss et al., 1994). En Amérique du Nord, l'influenza de type A est reconnu comme étant un des principaux agents impliqués dans les affectations respiratoires touchant le porc (Hinshaw et al., 1978; Easterday, 1986). Les pertes économiques attribuables au virus influenza porcin sont de ce fait très importantes (Conseil canadien du porc, 1995). Au Québec notamment, la production de porcs représente 31% de la production nationale et 30% de cette production est exportée vers d'autres pays. Selon le Conseil Canadien du porc (1995), l'industrie porcine a généré en 1995 des revenus se chiffrant à environ un milliard de dollars pour l'ensemble des producteurs de porcs au Canada.

L'influenza de type A aurait été isolé chez le porc pour la première fois aux États-

Unis en 1930 par Richard Shope (Shope, 1931) où il aurait probablement été introduit suite à la pandémie de 1918 (Neumeier et al., 1994). Le virus influenza porcin A (H1N1) est le virus animal faisant le plus l'objet de surveillance de la part de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) au niveau de la santé publique, puisqu'il a été démontré qu'il se transmet à l'homme et aux espèces aviaires (Webster et al., 1992). Tout comme le canard, le porc est un réservoir pour le virus et il serait également un hôte intermédiaire potentiel pour l'émergence de nouveaux virus recombinants (Castrucci et al., 1993) pouvant être à l'origine d'une nouvelle pandémie (Donatelli et al., 1991). Une étude réalisée à travers le monde sur l'influenza porcin A (H1N1) a permis d'identifier deux variants antigéniques dont la distribution géographique différait considérablement. Le premier, désigné "US", est apparenté aux souches porcines circulant en Amérique du Nord alors que le second nommé "Europe" s'apparente plus aux souches d'influenza de type A (H1N1) isolées chez les espèces aviaires présentes dans plusieurs pays européens (Hinshaw et al., 1984). Bien que le sous-type H1N1 soit le grand responsable des infections grippales touchant le porc, un second sous-type (H3N2) responsable de la grippe porcine a récemment été identifié à la fois en Amérique de Nord et en Europe (Chambers et al., 1991; Webster et al., 1992; Browm et al., 1997). En Amérique du Nord, depuis 1965, le virus influenza porcin A (H1N1) s'est avéré assez stable tant au niveau antigénique (Sheerar et al., 1989; Noble et al., 1993) que génétique (Luoh et al., 1992) et ce, malgré l'émergence de nouveaux variants aux États-Unis (Olsen et al., 1993) et au Canada (Dea et al., 1992b).

Au Québec, en 1981, une souche d'influenza porcin A (H1N1) causant les symptômes classiques associés au virus de la grippe a été identifiée chez les populations porcines et elle a été nommée; A/Swine/Québec/192/81 (SwQc81) (Morin et al., 1981). En 1990, l'apparition de maladies respiratoires chroniques chez le porc (Morin et al., 1990) a mené à l'identification d'une seconde souche d'influenza porcin A (H1N1) nommée A/Swine/Québec/5393/91 (SwQc91) (Dea et al., 1992b). Ce nouveau variant a par la suite été associé à la pneumonie proliférative nécrosante (PPN) diagnostiquée chez les porcelets en bas âges et responsable d'un haut taux de mortalité chez les nouveaux-nés. Ce type de pneumonie très contagieuse cause des symptômes externes comparables à ceux de la grippe

porcine classique et est souvent accompagnée d'infections secondaires multiples. De plus, les poumons des porcs infectés présentent des lésions à la fois macroscopiques et microscopiques (Morin et al., 1990; Girard et al., 1992).

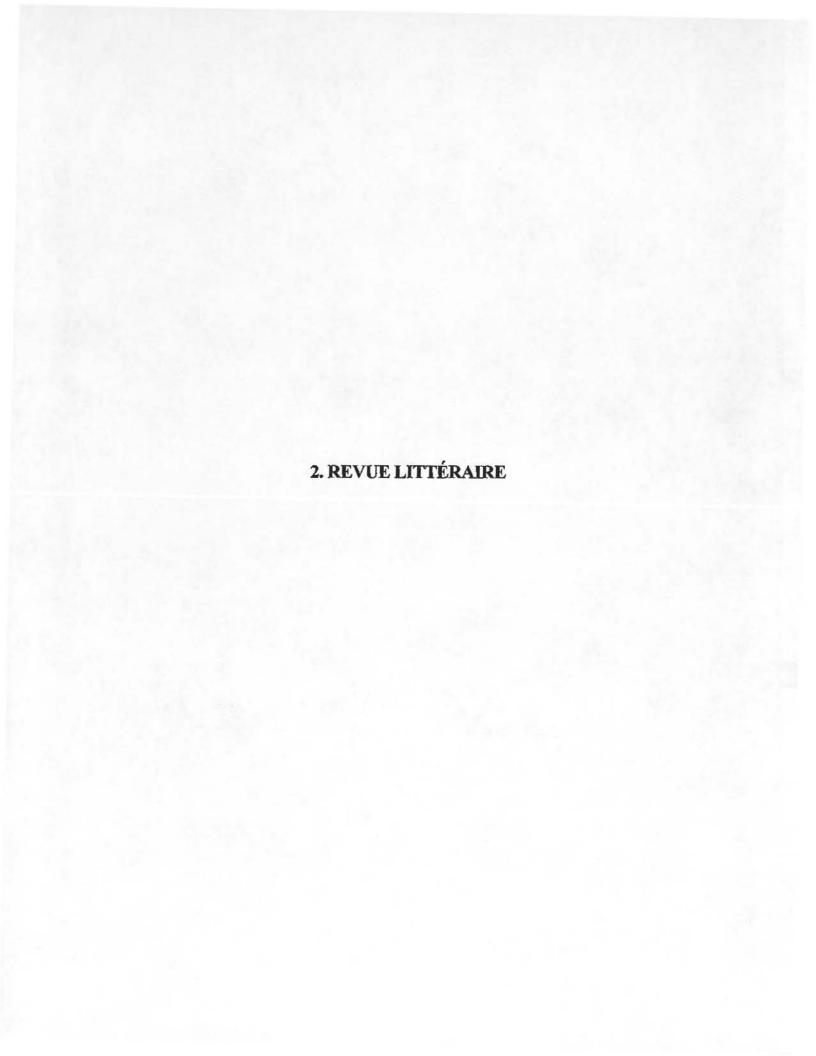
Des études antérieures ont permis de démontrer, à l'aide de test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), que la protéine hémagglutinine (HA), du variant SwQc91 associé à la PPN, était antigéniquement apparentée mais distincte de celle des souches porcines américaines et québécoises de référence: A/Sw/New Jersey/8/76 et SwQc81 (Dea et al., 1992b). Par la suite, les travaux de N'Diaye (1995) ont permis de produire un anticorps monoclonal (AcMo) dirigé spécifiquement contre un déterminant antigénique de la souche variante SwQc91, ce qui a permis de la différencier des autres souches nord-américaines responsables d'épidémies de grippe porcine classique. La production de cet AcMo a également permis de développer un test ÉLISA de compétition pouvant servir au dépistage d'anticorps spécifiques, produits contre le variant SwQc91, chez les porcs présentant les signes cliniques associés à la PPN (Arora et al., 1997a).

Une étude génomique comparative, réalisée par cartographie des oligonucléotides des ARN viraux totaux (ARNv), a démontré qu'il existait une divergence de 5% entre les souches SwQc81 et SwQc91 (Rekik et al., 1994). Cette différence se traduit, au niveau des protéines externes, par la substitution de 14 acides aminés (aa) dans la portion HA1 de la protéine HA du nouveau variant, et deux de ces substitutions sont localisées plus précisément dans les deux sites antigéniques majeurs Sb et Ca. Cette différence se traduit également par l'absence d'un site potentiel de gly cosy lation pour le variant SwQc91 (Rekik et al., 1994). De plus, les études effectuées sur le gène viral qui code pour la protéine neuraminidase (NA) ont permis de noter 23 changements en aa pour la souche SwQc91. Cette divergence au niveau génomique pourrait affecter les propriétés antigéniques de la protéine, puisque les changements semblent affecter un site antigénique et entraîner le déplacement d'un site potentiel de gly cosy lation situé sur la portion de la tige de la protéine NA de la souche SwQc91 (Arora et al., 1997b).

Il existe une troisième protéine transmembranaire, la protéine M2, qui possède une partie externe (Lamb et al., 1985; Zebedee et Lamb, 1988). La protéine M2 tout comme la protéine M1, qui elle est située à l'intérieur du virus, est codée à partir du gène de la protéine de la matrice, représenté par le segment #7 de l'ARNv (Briedis et al., 1982). L'étude de la protéine de la matrice (M) permettrait donc de comparer à la fois les changements internes et externes associés à la nouvelle souche (SwQc91). Également, cette étude est la première réalisée sur les protéines M1 et M2 de la souche SwQc91. De plus, l'avènement de la biologie moléculaire, qui a permis le clonage rapide de gènes viraux ainsi que l'expression de protéines dans des sy stèmes d'expression procary otes et eucary otes, permettrait d'envisager l'utilisation de la protéine M1 recombinante (PMR) dans le but d'induire une immunité chez l'hôte.

La présente étude a été menée avec comme objectifs principaux:

- 1) De comparer les séquences génomiques des protéines M1 et M2 pour les souches SwQc81 et SwQc91.
- 2) De produire la PMR dans un vecteur d'expression procary ote et de la purifier.
- 3) D'évaluer l'antigénicité et l'immunogénicité de la PMR.



## 2.1 Caractéristiques générales du virus influenza

#### 2.1.1 Taxonomie

Le virus influenza appartient à la famille des Orthomyxoviridae, du genre influenza virus qui a été récemment divisé en quatre types; les types A et B, le type C et un dernier moins connu qui est associé au virus Thogoto. Les propriétés antigéniques de la protéine M1 et de la nucléoprotéine (NP) permettent de différencier les trois types sérologiques répertoriés, soit A, B et C (Murphy et Webster, 1990). Le virus de type A infecte les hommes, plusieurs espèces de mammifères tels que le porc, le cheval et la baleine ainsi qu'une grande variété d'espèces aviaires, alors que le type B infecte seulement l'homme (Kilbourne, 1987). Quant au virus de type C, bien qu'il infecte principalement l'homme il est également responsable des infections chez le porc en Chine (Guo et al., 1983; Yuanji et Desselberger, 1984). Le virus influenza de type A peut être divisé en sous-types selon les propriétés antigéniques des gly coprotéines de surface; l'hémagglutinine (HA) et la neuraminidase (NA). À ce jour 15 sous-types de HA (Röhm et al., 1996) et 9 sous-types de NA (Lin et al., 1994) ont étérépertoriés. Les sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 sont présents chez l'homme lors d'infections causées par le virus influenza de type A (Air et al., 1987; Shaw et al., 1992), alors que les sous-types H1N1, principalement, et H3N2 sont impliqués lors d'infections causées par le virus chez le porc (Webster et al., 1992).

## 2.1.2 Propriétés phy sico-chimiques

Les Orthomy xoviridae sont composés de 0,8-1% d'ARN, de 70% de protéines, de 20% de lipides et entre 5-8% d'hydrates de carbone (Choppin et Compans, 1975; Kilbourne, 1987). La taille des virions des types A et B se situe entre 80 et 120 nanomètres (nm) de diamètre (Lamb et Choppin, 1983; Zuckerman, 1996) et leur masse moléculaire est d'environ 250 X 10<sup>3</sup> kilodaltons (kDa) (Kilbourne, 1987). La densité du virus sur un gradient de saccharose est 1,19 grammes/centimètre cube (g/cm<sup>3</sup>) et son coefficient de sédimentation (s) se situe entre 700 et 800s. L'infectivité du virus diminue lorsqu'il est soumis à des pH acides ou qu'il est mis en présence de ray ons ultraviolets (UV). Il est également possible d'inactiver

rapidement le virus à des températures supérieures à 56°C (Klenk et al., 1991).

## 2.1.3 Morphologie

Le virus grippal isolé à partir de souches adaptées pour le laboratoire est composé de particules virales sphériques (Zuckerman, 1996), alors qu'il est pléomorphe lorsqu'il provient d'isolats frais (Murphy et Webster, 1990). La particule virale sphérique présente à sa surface les glycoprotéines HA et NA représentées sous forme de spicules. Une couche de lipoprotéines provenant de la cellule hôte enveloppe la particule virale et sous cette enveloppe lipidique se retrouve la protéine de la matrice M1 qui forme une couche renfermant la nucléocapside (Kilbourne, 1987). Cette dernière contient huit segments d'ARN à polarité négative ayant des extrémités 5' et 3' conservées (Klenk et al., 1991). Les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) hélicoïdaux sont formés par l'association des segments d'ARN codant pour la NP et les polymérases virales basiques 1 et 2 (PB1, PB2) et la polymérase acide (PA) (Lamb et Choppin, 1983) (Figure 1).

#### 2.1.4 Protéines

Le génome du virus influenza de type A est constitué de huit segments d'ARN codant pour 10 polypeptides (Figure 1). Les segments 1 à 6 codent respectivement pour les protéines structurales PB2, PB1, PA, HA, NP et NA. Le segment 7 code pour 2 protéines; la protéine structurale M1 située à l'intérieur de la membrane lipidique et la protéine non-structurale M2 située à la surface du virion. Le segment 8, quant à lui, code pour deux protéines non-structurales; NS1 et NS2 (Lamb et Choppin, 1983).

Les polymérases virales PB2, PB1 et PA ont les masses moléculaires (Mr) les plus élevées soit 85,7 kDa, 86,5 kDa et 84,2 kDa (Lamb et Choppin, 1983). La protéine PB2 est constituée de 759 acides aminés (aa) et elle permet la liaison de la transcriptase avec la coiffe des ARN messagers (ARNm) cellulaires utilisés pour la synthèse des ARNm viraux (Ulmanen et al.,1981; Beaton et Krug 1986). La protéine PB1, constituée de 757 aa, est impliquée dans certaines activités catalytiques, elle joue notamment un rôle dans la

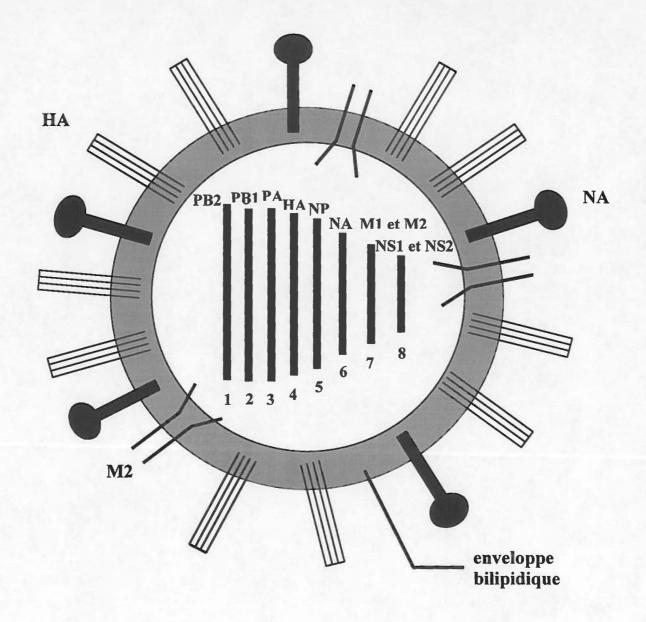


Figure 1: Représentation schématique du virus influenza

Le virus influenza est un virus enveloppé dont le génome segmenté est composé de 8 brins d'acide ribonucléique (ARN) monocaténaire à polarité négative qui forment, en association avec les polymérases (PB1, PB2 et PA) et la nucléoprotéine (NP), les complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Sur l'enveloppe bilipidique provenant de l'hôte cellulaire sont ancrées les glycoprotéines de surface; HA et NA ainsi que la protéine M2. Sous l'enveloppe, on trouve la protéine matricielle M1. Les protéines NS1 et NS2 sont des protéines non structurales. La représentation schématique du virus a été réalisée à l'aide d'un logiciel de présentation.

polymérisation et l'élongation de la chaîne de nucléotides et elle est impliquée dans la réplication de l'ARN (Huang *et al.*, 1990). La protéine PA (716 aa), dont le rôle n'est pas encore bien défini, semble aussi impliquée dans la réplication de l'ARN (Barcena *et al.*, 1994). Le nombre de molécules présentes dans le virion pour chacune des trois protéines se situe entre 30 et 60 (Lamb, 1989).

Le 4<sup>e</sup> segment code pour la protéine hémagglutinine (HA). Cette gly coprotéine est constituée de 566 aa et une particule virale contient environ 500 molécules de HA (Lamb et Choppin, 1983). La protéine HA joue plusieurs rôles. En plus d'être une composante majeure de la surface du virion elle est impliquée dans l'infection du virus influenza. En effet, la protéine HA se lie au récepteur de l'acide sialique, présent à la surface cellulaire, rendant ainsi possible l'attachement d'une particule virale à la cellule (Marsh et Helenius, 1989). En médiant la fusion de la membrane de la particule virale endocytosée avec la membrane endosomale de la cellule, elle permet la pénétration de la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule (Wiley et Skehel, 1987; Wilson et Cox, 1990). La protéine HA est l'antigène majeur du virus et par conséquent elle est la cible des anticorps neutralisants produits contre le virus (Wilson et Cox, 1990). Le virus influenza est à l'origine d'épidémies qui sont associées aux changements de la structure antigénique de la protéine HA (Wiley et Skehel, 1987).

La protéine HA est présente à la surface de la cellule sous d'un trimère de 225 kDa composé de trois monomères identiques de 75 kDa, liés de façon non covalente. Cette dernière est synthétisée en un polypeptide simple (HA0) dans le réticulum endoplasmique (Wilson et Cox, 1990). Tout dépendant de la souche virale, du type de cellule hôte et des conditions de croissance, la protéine HA peut être clivée ou non. La formation de 2 chaînes liées par des ponts disulfure, représentées par les régions HA1 (47 kDa) et HA2 (29 kDa), résulte du clivage de la protéine HA (Lamb, 1989). L'infectivité du virus dépend du clivage de la protéine HA qui devient un déterminant important dans la pathogénicité et la propagation du virus. La région N-terminale de la partie HA2 est hydrophobe et elle est hautement conservée chez la majorité des protéines HA. Cette dernière est impliquée dans les activités de fusion réalisées par la protéine HA (Lamb et Krug, 1996). Tout dépendant du sous-type,

le nombre de résidus perdus lors du clivage protéolytique entre HA1 et HA2 se situe entre 1 et 6. Par conséquent, la région HA1 contient entre 319 et 326 aa alors que la région HA2 en contient soit 221 ou 222 aa. La perte unique d'un résidu arginine (R) lors du clivage protéolytique de la protéine HA est cataly sée par une enzyme cellulaire soit l'exopeptidase de la carboxy peptidase de type B, alors qu'une seconde enzyme, la try psine, est responsable de l'initiation du clivage de la protéine (Lamb, 1989).

Des études comparatives au niveau des séquences nucléotidiques, réalisées à l'aide d'isolats recueillis dans la nature et de mutants sélectionnés au laboratoire sous la pression d'anticorps (Ac), ont permis l'identification de 4 sites antigéniques, A, B, C et D, sur la structure tridimensionnelle de la protéine HA (Laver et al., 1981; Concannon et al., 1984). L'existence d'un cinquième site, E, est probable (Wiley et al., 1981). Quant à la protéine HA du virus influenza de sous-type H1N1, quatre sites antigéniques ont également été identifiés, soient Ca et Cb, communs à plusieurs souches et Sb et Sa qui eux sont spécifiques à chaque souche (Lubeck et Gerhard, 1981; Wilson et Cox, 1990). Les anticorps utilisés neutralisent l'infectivité du virus pour chacun des cinq sites antigéniques.

L'exposition de la HA à de faibles pH engendre des changements conformationnels irréversibles qui entraînent la fusion du virus avec la membrane cellulaire (Bullough *et al.*, 1994). Le clivage de la protéine HA0 en HA1 et HA2 est un pré-requis au changement de conformation observé en présence de pH faibles et c'est également un pré-requis à l'infectivité du virus (Klenk *et al.*, 1975; Lazarowitz et Choppin, 1975). Les protéines HA contenant la séquence RXR/RR sont clivées à l'intérieur de la cellule par une protéase présente dans le réseau trans-golgien (Stieneke-Grober *et al.*, 1992). Cependant, les protéines HA qui possèdent uniquement un résidu arginine (R), ce qui est le cas pour les souches humaines, sont impossibles à cliver en culture cellulaire. Ce problème peut être résolu grâce à l'ajout de la try psine qui clive la protéine. De plus, il semble que la virulence du virus soit associée au site de clivage de la protéine puisqu'il a été possible de constater que les souches les plus virulentes sont celles qui possèdent plus d'un résidu R (Nestorowicz *et al.*, 1987; Kawaoka et Webster, 1988).

Le segment 5 d'ARN viral code pour la nucléoprotéine (NP). La NP est une protéine structurale majeure qui interagit avec les segments d'ARN pour former le complexe de la ribonucléoprotéine (RNP). La NP est également un antigène spécifique qui permet l'identification des différents types du virus influenza (Boer et al., 1990). Son gène contient 1565 nucléotides codant pour une protéine de 498 aa riche en arginine. Elle a une masse moléculaire d'environ 56 kDa et elle est phosphorylée (Shaw et al., 1992). Suite à sa synthèse dans le cytoplasme, la nucléoprotéine se dirige vers le noyau. Le ciblage du noyau est une propriété intrinsèque de la NP (Lin et Lai, 1983; Ryan et al., 1986) et une analy se moléculaire a permis d'identifier les résidus 327 à 345 comme étant suffisants et nécessaires au transport de la NP vers le noyau (Davey et al., 1985). Il existe peu d'informations sur le mécanisme d'assemblage de la NP. Cependant, il est rapporté dans la littérature qu'elle initie la transcription (Barcena et al., 1994) ainsi que l'élongation de la chaîne d'ARN (Shapiro et Krug 1988) et on lui attribue également un rôle d'anti-terminaison lors de la synthèse de l'ARNm (Beaton et Krug 1986).

La neuraminidase est la seconde gly coprotéine membranaire du virion de l'influenza qui diffère selon les sous-types. Son importance vient du fait que son activité biologique lui permet d'enlever l'acide sialique des glycoprotéines (Gottschalk, 1957) et du fait qu'elle est un déterminant antigénique majeur qui subit des variations antigéniques. Son rôle dans le cycle viral du virus influenza demeure inconnu. La protéine NA pourrait permettre le transport du virus à travers la couche de mucine, présente dans le tractus respiratoire, permettant ainsi au virus d'infecter les cellules épithéliales cibles (Palese et al., 1974). La protéine NA est un homotétramère de 240 kDa qui peut être détaché de la membrane du virion à l'aide de protéases (Lamb, 1989). En microscopie électronique cette protéine a la forme d'un champignon munie d'une tête et d'une queue. Le gène de la protéine représenté par le segment 6 d'ARN viral contient 1413 nucléotides et il code pour une protéine de 453 aa (Laver et Valentine, 1969). La neuraminidase possède un seul domaine hy drophobique qui agit à la fois comme signal pour empêcher le clivage et comme domaine d'ancrage, ce qui permet à la protéine d'être bombardée sur la membrane du réticulum endoplasmique et d'y être attachée avec stabilité (Lamb et Krug, 1996). Contrairement au type B, la queue cytoplasmique est conservée parmi les sous-types du virus influenza de type A. Les

domaines transmembranaires des sous-types du type A et des virus de type B partagent la propriété d'hy drop hobicité mais leurs séquences diffèrent. La tige est très variable entre les diffèrents sous-types (Colman et al., 1983). La protéine NA possède quatre sites antigéniques identifiés pour le type A (Colman et Ward, 1985). Contrairement aux Ac dirigés contre la protéine HA, les Ac dirigés contre la protéine NA ne sont pas neutralisants (Kilbourne et al., 1968; Rott et al., 1974). Le segment 7 code pour la protéine de la matrice dont les propriétés seront résumées à la section 2.2.

Le segment d'ARN #8 du virus influenza de type A contient 890 nucléotides et il possède un large cadre de lecture. Ce segment code pour les deux protéines non-structurales, NS1 et NS2. La protéine NS1 est une protéine d'environ 26 kDa codée par un transcript d'ARNm colinéaire. Cette protéine n'a pas encore été détectée dans le virion, cependant elle est abondamment présente dans les cellules infectées par le virus. NS1 est une protéine phosphory lée qui est exprimée surtout durant la phase précoce de l'infection (Enami et al., 1994). Le rôle exact de cette protéine n'est pas bien connu, cependant des expériences réalisées avec des mutants thermosensibles ayant une protéine NS1 défective, démontrent une réduction de l'expression de la protéine M1 durant la phase tardive Koennecke et al., 1981; Wolstenholme et al., 1980). Ce qui semble démontrer que la protéine NS1 stimulerait la traduction de la protéine M1. De plus, il a été démontre par Alonso-Caplen et al. (1992), tel que rapporté par Qiu et Krug (1994) que: NS1 est un régulateur post-transcriptionnel de l'expression des gènes et qu'elle régule également l'exportation de l'ARNm viral épissé de la protéine NS2, en inhibant la sortie du noy au des ARNm possédant une queue poly (A) grâce à la liaison de la NS1 à la queue poly (A) (Qiu et Krug 1994).

La protéine NS2, quant à elle, est codée par un ARNm épissé et elle a une Mr d'environ 14 kDa et contrairement à NS1, la protéine NS2 est synthétisée seulement lors de la phase tardive de l'infection. Elle est surtout présente dans le noy au des cellules infectées et tout comme NS1, son rôle exact n'est pas connu. Les expériences d'Odagiri et Tobita (1992) ont démontré qu'une mutation dans NS2 mène à une réplication aberrante des gènes de la polymérase virale. Pendant longtemps la protéine NS2 était considérée comme étant non-structurale puisqu'elle n'était pas présente dans le virion. Mais récemment, Richardson et

Akkina (1992) ont démontré la présence de NS2 dans des particules virales. Par la suite, des études menées par le groupe d'Yasuda *et al.* (1993) ont permis d'établir que le nombre de molécules de NS2 présentes à l'intérieur du virion se situait entre 130 et 200.

## 2.1.5 Cycle de réplication du virus influenza

La réplication du virus influenza débute avec l'adsorption du virus à la surface de la cellule, via les sites de liaison des récepteurs présents à l'extrémité de la protéine HA et qui se lient aux résidus d'acide sialique ( $\alpha$  2,6 ou  $\alpha$  2,3 galactose) présents sur les gly coprotéines ou les gly colipides situés à la surface des cellules (Rodgers et al., 1983; Marsh et Helenius, 1989). Le virus pénètre à l'intérieur de la cellule par un phénomène d'endocytose qui implique l'internalisation du virus dans des vésicules de clathrine formées par l'invagination de la membrane plasmique. Suite à l'internalisation, la clathrine est libérée afin de permettre la fusion des vésicules avec l'endosome. L'acidification de l'endosome permet la décapsidation du virus. Lorsqu'elle est soumise à des pH acides, la protéine HA adopte une forme qui rend la fusion entre la membrane virale et la membrane cellulaire possible, ce qui permet au complexe ribonucléoprotéique (RNP) du virus de traverser la membrane du virion et de l'endosome et de pénétrer dans le cytosol (Carr et Kim, 1994). Le canal ionique de la protéine M2 est également impliqué dans la décapsidation. En effet, le fait que le pH soit faible permet l'activation du canal ionique ce qui permet le passage des ions de l'endosome à l'intérieur du virus. L'acidification de l'endosome modifie les interactions protéine-protéine et permet la libération de la protéine M1 du complexe de la RNP. Par conséquent, le bloquage du canal empêcherait la dissociation de la protéine M1 du complexe de la RNP qui ne pourrait plus pénétrer dans le noyau (Takeuchi et Lamb, 1994).

Suite à sa libération dans le cytoplasme, la nucléocapside migre vers le noyau où débute la réplication du génome viral qui s'effectue en trois phases (Marsh et Helenius, 1989). La première phase est indépendante de la synthèse protéique et elle implique la transcription primaire qui conduit à la synthèse de deux types d'ARN. Le premier type étant les ARN messagers (ARNm) qui sont coiffés et polyadény lés et qui pourront être traduits en protéines alors que le second type comprend les ARN complémentaires (ARNc), ne

possédant ni coiffe ni séquence polyadény lée, qui serviront de matrice pour les ARN viraux (ARNv) (McCauley et Mahy, 1983). Chacun des huit segments d'ARN de polarité négative participe à la production des deux types d'ARN et ce à l'aide de fragments d'ARN méthy lés qui dérivent des transcrits de l'ARN polymérase II de la cellule-hôte ainsi que des trois protéines virales PB1, PB2 et PA (Shapiro et Krug 1988).

Durant la seconde phase, la transcription secondaire précoce s'effectue et elle dépend de la synthèse protéique. Les phases d'expression des gènes du virus influenza surviennent lors de changements quantitatifs au niveau de la transcription individuelle des segments d'ARN. La synthèse d'ARNc atteint son maximum 30 à 90 minutes après l'infection, et elle est accompagnée d'une synthèse amplifiée des ARNm et des ARNv des segments 5 et 8 correspondant respectivement aux protéines NP et NS (Lamb et Choppin, 1983; McCauley et Mahi, 1983). Lors de la dernière phase, là où s'effectue la transcription secondaire tardive, la synthèse des ARNm et des ARNv des segments 4, 6 et 7 correspondant aux protéines HA, NA et M est augmentée alors que celle des ARNm, ARNc et ARNv du segment 8 diminue. La synthèse des ARNm ainsi que des ARNv du segment 5, représentant la NP, demeure élevée tout au long de la transcription secondaire alors que celle des segments 1 à 3 correspondant respectivement aux trois polymérases virales PB2, PB1 et PA demeure faible (McCauley et Mahi, 1983).

La synthèse des protéines virales s'effectue dans le cytoplasme. Les trois polymérases virales (PB2, PB1 et PA) ainsi que la protéine NP nouvellement synthétisées s'associent aux segments génomiques pour former le complexe ribonucléoprotéique (RNP). La liaison du complexe de la RNP à la protéine M1 assure le transfert de celui-ci du noy au au cytoplasme. La dernière étape comprend l'assemblage du virus et elle implique la liaison du complexe RNP-M1 à la membrane plasmique sur laquelle viendront se greffer par la suite les deux protéines de surface; HA et NA. La particule nouvellement formée devra contenir une copie de chacun des 8 segments d'ARN afin de permettre la poursuite du cycle de réplication (Lamb et Choppin, 1983).

### 2.2 Protéine de la matrice

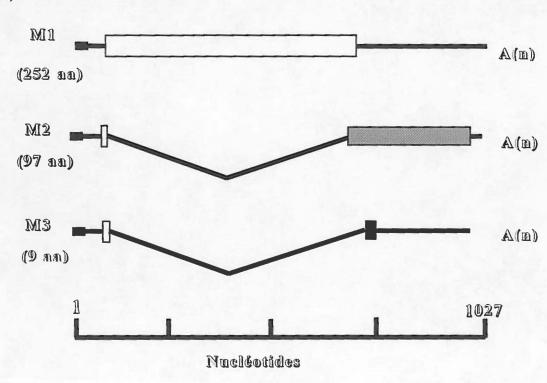
Le gène de la protéine de la matrice (M), représenté par le segment #7 d'ARNv, contient 1 027 nucléotides et code pour deux protéines, la protéine interne M1 et la protéine externe M2 et pour un petit peptide de 9 aa nommé M3 (Figure 2A) identifié par les groupes d'Inglis et Brown (1981) ainsi que Lamb et collaborateurs (1981) tel que rapporté par Valcárcel et al. (1993). Différentes études réalisées sur les séquences nucléotidiques de la protéine M ont démontré que celle-ci est grandement conservée, et ce d'un sous-type à l'autre. En effet, les séquences nucléotidiques de souches humaines de sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 isolées durant les 43 dernières années suggèrent que le segment d'ARN #7 serait demeuré le même malgré les changements antigéniques des protéines HA et NA (Hall et Air, 1976).

L'expression des protéines M1 et M2 du virus influenza est complexe puisqu'elle implique la transcription différentielle de gènes bicistroniques. La synthèse de l'ARNm du virus influenza se fait dans le noyau de la cellule. Ceci permet au virus d'utiliser la machinerie cellulaire afin de réaliser l'épissage et de générer plusieurs transcrits à partir de gènes individuels. La transcription de la protéine M du virus influenza est particulière puisqu'à partir d'un seul ARNm sont traduites les protéines M1 et M2. La protéine M1 est colinéaire et elle est le produit majeur du segment d'ARNv #7. Elle possède un cadre de lecture ouvert qui est continu et qui débute à 25 nucléotides de l'extrémité 5' de l'ARNm pour se terminer au nucléotide #844 (Hiebert et al., 1986). La protéine M2, quant à elle, possède un cadre de lecture en deux parties. La première débute au même endroit, à l'extrémité, que la protéine M1 et elle composée de 51 nucléotides. Par la suite, les 689 nucléotides suivants sont épisés du gène ce qui ramène les 51 nucléotides à côté du nucléotide #740. La deuxième partie du cadre de lecture, située à environ 700 nucléotides de l'extrémité 3' de l'ARNm, code pour la majorité de la protéine M2 (Hiebert et al., 1986).

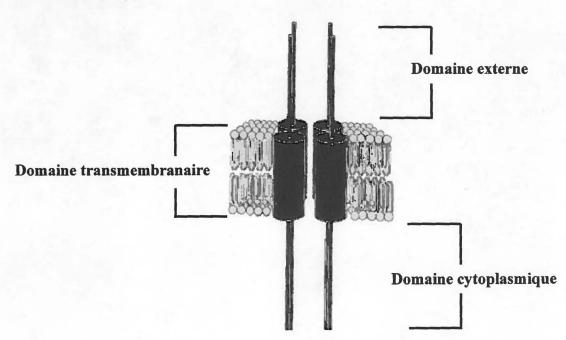
On retrouve le même sy stème d'épissage pour la protéine M de l'influenza de type B, cependant aucune protéine M2 n'a encore été identifiée (Briedis *et al.*, 1982). En ce qui concerne l'influenza de type C, la protéine M est codée par le segment d'ARNv #6. Tout

Figure 2: Représentation schématique du segment 7 de l'ARN viral, codant pour les protéines M1, M2 et M3, ainsi que du canal ionique de la protéine M2.

Le gène de la protéine de la matrice (M), représenté par le segment 7 de l'ARNv, contient 1027 nucléotides et code pour 2 protéines, la protéine M1 (composée de 252 aa) et la protéine M2 (composée de 97 aa) ainsi que pour un petit peptide de 9 aa nommé M3 (en A). La protéine M2 est un canal ionique composé de trois domaines (en B). Le domaine extracellulaire possède une extrémité N-terminale de 23 résidus en aa, le domaine transmembranaire possède 19 aa alors que le domaine cytoplasmique est composé de 54 résidus en aa.



## B) Canal ionique



comme les types A et B l'ARNm du type C est épissé, cependant aucune protéine telle la protéine M1 des types A et B n'a été identifiée pour le type C (Yamashita et al., 1988).

#### 2.3 Protéine M1

## 2.3.1 Caractéristiques générales

La protéine M1 est constituée de 252 aa et a une Mr d'environ 28 kDa. L'ARNv qui représente la protéine M1 est transcrit en ARNm qui est lui-même traduit, au tout début de l'infection, en protéine M1 (Lamb et Choppin, 1983). La protéine M1 représente 30 à 46% du contenu en protéines virales ce qui en fait la protéine existant le plus en abondance dans le virion (Bucher et al., 1987). Il est possible d'en retrouver 3 000 molécules par particule virale. Cette protéine est également la plus stable du virus influenza et la plus conservée parmi les différents sous-types de type A identifiés. Elle permet également de différencier un virus influenza de type A d'un autre de type B, tel que démontré par Schild (1972) et rapporté par Bucher et al. (1987). La protéine M1 est également considérée comme un antigène (Ag) particulièrement stable. En effet, elle peut être bouillie et traitée avec de forts détergent, tel le SDS, et garder son potentiel antigénique. De plus, la protéine M1 est qualifiée d'excellent immunogène (Bucher et al., 1987).

#### 2.3.2 Structure

La protéine M1 est une protéine structurale, qui à cause de sa présence marquée dans le virion, forme un genre de carapace sous la couche bilipidique de l'enveloppe ce qui lui confère sa rigidité (Lamb et Choppin, 1983). En coloration négative, les protéines M1 sont alignées les unes à côté des autres de telle sorte qu'elles ressemblent à une empreinte digitale (Ruigrok et al., 1989). La protéine contient un motif de liaison au zinc et ce domaine est conservé parmi les protéines M1 des virus de types A et B. La fonction de ce motif sera discutée à la section 2.3.4. La séquence de ce domaine, contrairement à ce qui avait déjà été proposé (Wakefield et Brownlee, 1989), n'est pas impliquée dans la liaison de la protéine M1 avec l'ARN, puisque la perte d'une seule cystéine serait responsable de la perte de ce

domaine. Advenant le cas, il a été observé que cela n'empêche pas pour autant la liaison entre la protéine et l'ARN (Elster et al., 1997).

## 2.3.3 Sites antigéniques

Les sites antigéniques sont définis comme étant des régions immunodominantes qui peuvent réagir avec des anticorps. Il a été possible d'identifier quatre sites antigéniques et fonctionnels pour la protéine M1. Ces épitopes ont été localisés à différentes régions de la protéine. En effet, l'épitope 1 semble situé au tiers de l'extrémité N-terminale de la protéine, plus précisément entre les aa 46-89 alors que l'épitope 2 serait situé au deux tiers de l'extrémité C-terminale de la protéine entre les aa 129-164. Les épitopes 3 et 4, quant à eux, sont situés entre les aa 45-119 (Ye et al., 1987; Ye et al. 1989).

Certains rôles ont été attribués à deux des quatre épitopes. L'épitope 1 serait associé avec un site responsable de la liaison de la protéine M1 avec la membrane lipidique, alors que l'épitope 2 serait impliqué dans l'activité d'inhibition de la transcription du complexe de la RNP lors de la liaison de la protéine M1 à ce complexe (Ye et al., 1989). D'autres études, également réalisées par Ye et collaborateurs (1989), semblent démontrer l'existence d'un deuxième site antigénique, associé au site de liaison à l'ARN responsable de l'inhibition de la transcription. La région située entre les aa 80-109 correspondrait probablement à l'épitope 4, et il semblerait qu'elle soit impliquée dans l'activité d'inhibition de la transcription tout comme la région correspondant à l'épitope 2.

#### 2.3.4 Fonctions

En plus de procurer une certaine rigidité à la membrane bilipidique du virus, la protéine M1 est multifonctionnelle et elle peut interagir avec d'autres protéines virales. En effet, la protéine M1 joue un rôle dans l'assemblage du virus ainsi que dans le bourgeonnement viral en interagissant avec les queues cytoplasmiques des protéines HA, NA et M2 et avec les segments du complexe de la RNP virale (RNPv) (Zhang et Lamb, 1996). Une des particularités du virus influenza est qu'il se réplique dans le noyau mais qu'il

bourgeonne à partir de la membrane cytoplasmique. Une série d'importation et d'exportation à travers les pores nucléaires est donc nécessaire (Zhang et Lamb, 1996). La protéine M1 est impliquée dans le transport de la RNPv à l'intérieur ainsi qu'à l'extérieur du noyau via les pores nucléaires (Martin et Helenius, 1991), selon que la protéine soit liée ou non à la RNPv. Il existe une région située entre les aa 101 et 105 de la protéine M1 qui promouvoit la migration de la protéine du cytoplasme au noyau (Ye et al., 1995) et qui permet à la protéine M1 de se lier à l'ARN (Elster et al., 1997). Il a été rapporté qu'un faible pH à l'intérieur de l'endosome provoque la dissociation de la protéine M1 de la RNPv permettant ainsi l'entrée de la RNPv dans le noyau. Plus tard au cours de l'infection, la protéine M1 doit se réassocier avec la RNPv afin de permettre l'assemblage de la particule virale (Bui et al., 1996).

La protéine M1 est également impliquée dans la régulation de la transcription de l'ARNv. Des expériences réalisées par Hankins et al. (1990) ont corroboré ce qui avait déjà été énoncé par certains, au sujet du rôle de la protéine M 1 dans l'inhibition de la transcription (Ye et al., 1987, Zvonarjev et Ghendon, 1980). Ces derniers ont démontré que la protéine M1 inhibe les étapes de l'initiation et de la réinitiation de la transcription de l'ARNv de manière plus efficace que l'étape de l'élongation de la chaîne d'ARN. De plus, l'implication de la protéine NP dans ce processus d'inhibition semble essentielle car dans le cas où elle est retirée du complexe de la RNP, il a été noté que l'impact de la protéine M1 sur la transcription est négligeable. Ceci implique également que la NP possède un site de liaison permettant de lier la protéine M1 et que c'est cette liaison qui semble interférer avec les fonctions de l'ARN polymérase (Hankins et al., 1990). Ceci semble indiquer que la protéine M 1 joue un rôle de régulation dans la maturation du virus, puisqu'elle contrôle le passage de la réplication de l'ARN à l'assemblage du virus (Yasuda et al., 1993). Des études réalisées avec des mutants de la protéine M1 ont démontré que la région située entre les aa 91 et 111 est essentielle pour l'inhibition de la synthèse de l'ARN ainsi que pour la liaison de la protéine M1 à l'ARN (Watanabe et al., 1996). La protéine M1 semble également jouer un rôle au niveau du taux de croissance du virus (Yasuda et al., 1993) ainsi que dans le contrôle de la virulence de souches d'influenza adaptées, in vitro, à la souris (Smeenk et Brown, 1994).

La protéine M1 jouerait également un rôle d'agent antiviral qui serait assumé par le

motif de doigt de zinc (Nasser et al., 1996). Il a déjà été démontré, par Judd et al. (1992) tel que rapporté par Nasser et al. (1996), qu'un peptide synthétique formé de la région située entre l'aa 152 et 166 de la protéine M1, serait responsable de l'inhibition de la transcription du virus. Si l'on rajoute 4 aa à cette séquence (aa 148-166), ce nouveau peptide représente maintenant le motif du doigt de zinc et l'inhibition de la transcription est 1000 fois plus efficace que celle observée avec le peptide formé des aa 152-166. Ceci suggère que le motif du doigt de zinc de la protéine M1 aurait une activité antivirale. Cette activité antivirale a été démontrée contre des virus influenza de type A et de type B (Nasser et al., 1996).

### 2.3.5 Réponse immunitaire

Des expériences ont démontré que la protéine M1 est capable d'engendrer une immunité à la fois humorale et cellulaire. Cependant, bien qu'il soit possible d'obtenir, suite à une immunisation, des anticorps dirigés contre la protéine M1 ces anticorps ne protègent pas contre une seconde infection aux virus. Il semble que l'immunité à médiation cellulaire soit la plus efficace pour protéger contre une infection virale (Webster et Hinshaw, 1977, Reay et al., 1989). Des expériences réalisées chez le furet ont démontré qu'il était possible d'obtenir une protection contre différentes souches d'influenza suite à l'immunisation avec l'ADN codant pour la protéine M1 (Donnelly et al, 1997).

#### 2.4 Protéine M2

## 2.4.1 Caractéristiques générales

L'ARNm transcrit à partir du segment 7 de l'ARNv subit un épissage alternatif et est traduit plus tard au cours de l'infection en une protéine de 97 aa qui correspond à la protéine M2 (Valcárcel et al., 1993) (Figure 2A). Elle a une Mr d'environ 14 kDa et, contrairement à la protéine M1, elle est présente en grande quantité à la surface des cellules infectées. Comme il est possible de retrouver une petite quantité de molécules (environ 23-60) exprimées à la surface du virion, la désignation de protéine non-structurale qui jusqu'à présent qualifiait la protéine M2 a été remise en question (Zebedee et Lamb, 1988). Contrairement aux autres

protéines de surface, HA et NA, la protéine M2 n'est pas glycosylée mais elle est phosphorylée (Sugrue *et al.*, 1990). Elle est une des plus petites protéines transmembranaires connues (Hughey *et al.*, 1992).

#### 2.4.2 Structure

La protéine M2 est un canal ionique qui est composé de trois domaines (Figure 2B). Le premier domaine, extracellulaire, possède une extrémité N-terminale composée de 23 résidus en aa. Le second domaine est transmembranaire et il possède 19 résidus en aa, alors que le dernier est un domaine intracy top lasmique représenté par une queue cy top lasmique composée de 54 aa tel que décrit par plusieurs auteurs et rapporté par Holsinger et al. (1995). Le canal ionique de la protéine M2 forme un homotétramère représenté soit par une paire de dimères qui possèdent des liens disulfures ou par un tétramère lié par des liens disulfures (Holsinger et Lamb, 1991; Sugrue et Hay, 1991; Zebedee et Lamb, 1985).

### 2.4.3 Sites antigéniques

La fabrication de huit peptides synthétiques représentant la séquence entière en aa de la protéine M2 a permis d'identifier trois épitopes présents sur la protéine. Le premier épitope serait situé à l'extrémité N-terminale entre les aa 2-18 alors que les épitopes 2 et 3 seraient situés à l'extrémité C-terminale de la protéine entre les aa 68-84 et 79-97 respectivement (Slepushkin et al., 1995). Certains rôles ont pu être attribués aux sites antigéniques de la protéine M2 et bien qu'ils doivent être précisés, ils seront discutés à la section 2.4.4.

#### 2.4.4 Fonctions

La production d'un anticorps monoclonal (AcMo) 14C2 dirigé contre l'épitope 1 (aa 2-18) de la protéine M2 a permis de lui attribuer certains rôles. En effet, grâce à cet AcMo il a été possible d'observer que la protéine M2 semble jouer le même rôle que la protéine NA au niveau de la réplication virale. La présence des anticorps dirigés contre la protéine M2

seraient capables d'inhiber la réplication du virus de type A, sans toutefois neutraliser l'infectivité de celui-ci, comme peuvent le faire les anticorps dirigés contre la protéine HA. Il a également été observé que la présence d'anticorps dirigés contre la protéine M2 permettait de réduire le temps de relargage de la particule virale et diminuait la charge virale présente suite à l'infection. Cependant ceci ne peut être attribué aux anticorps exclusivement ni à un ou à tous les sites antigéniques de la protéine M2, car le rôle joué par chacun reste à déterminer (Slepushkin et al., 1995). L'assemblage de la particule virale est également affecté par la présence de l'AcM o 14C2, tel que démontré par Hughey et al. (1995).

Le canal ionique de la protéine M2 permet l'entrée des ions à l'intérieur de la particule virale lors de la décapsidation du virus, ce qui a pour effet de moduler le pH des compartiments intracellulaires. De plus, la protéine M2 joue un rôle dans la maturation de la protéine HA (Sugrue et al., 1990) puisque suite à l'exposition du virion au pH acide présent à l'intérieur de la vésicule endosomale, la protéine HA, soumise à ce faible pH, subit un changement conformationnel qui entraîne la libération d'un peptide de fusion et permet la fusion entre la membrane virale et celle de la vésicule endosomale. Cette fusion permet au complexe de la RNP d'être libéré dans le cytoplasme puisque les ions ont pu pénétrer à l'intérieur du virus et briser les liens protéine-protéine entre le complexe de la RNP et la protéine M1 (Ciampor et al., 1992).

# 2.4.5 Réponse immunitaire

La protéine M2 est capable d'engendrer une immunité humorale puisqu'il a été possible de détecter des anticorps dirigés contre la protéine M2 dans le sérum de patients convalescents infectés par un virus influenza de sous-type H3N2 (Black et al., 1993a). Les études Slepushkin et al. (1995) ont démontré que, lorsqu'elle est injectée chez la souris, la protéine M2 protège contre une infection par le même virus ou par un virus hétérologue. De plus, les anticorps dirigés contre celle-ci pourraient être impliqués dans le phénomène de cytotoxicité cellulaire dépendante d'anticorps (ADCC) mais ceci reste à démontrer. Une diminution rapide de la charge virale chez des souris préalablement immunisées avec la protéine M2 et infectées, ainsi que la capacité de celle-ci à protéger contre des virus

hétérologues a permis de supposer l'implication d'une immunité à médiation cellulaire. La protéine M2 devient un bon candidat pour cibler les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques suite à une infection au virus influenza, d'autant plus qu'elle est abondamment présente à la surface des cellules infectées (Slepushkin et al., 1995).

## 2.5 Le virus influenza et le porc

## 2.5.1 Différents sous-types répertoriés

Le virus influenza de sous-type H1N1 est à l'origine d'épidémies affectant l'homme. Depuis son apparition en 1918, malgré une période d'accalmie entre les années 1957 et 1977, il est toujours responsable d'infections chez l'homme (Raymond et al., 1986). Le sous-type H1N1 serait apparu simultanément chez les porcs en 1918 et il aurait été isolé pour la première fois en 1930. Jusqu'en 1938 les porcs ne semblaient pas être affectés par le virus influenza H1N1 humain. Cependant, entre 1938 et 1940, une épidémie d'influenza chez les porcs a permis d'isoler des virus de type A. Ceci a mené à l'identification de souches antigéniquement et génétiquement reliées au virus influenza humain de sous-type H1N1 (Neumeier et al., 1994). Depuis, il a été possible d'isoler chez le porc deux autres sous-types du virus influenza de type A, le sous-type H1N2 et H3N2 (Castrucci et al., 1993). Cependant, le sous-type le plus fréquemment associé aux problèmes respiratoires chez les populations porcines, du centre et du nord des États-Unis (Chambers et al., 1991) ainsi que chez les populations porcines présentes au Québec (Gagnon et al., 1974), demeure le soustype H1N1. En ce qui concerne l'Europe, le sous-type H1N1 a été isolé pour la première fois chez les porcs en Italie (Donatelli et al., 1991) et tout comme au Canada (Morin et al., 1981) et en Angleterre (Brown et al., 1993) il y est responsable d'épidémies sévères de grippe porcine (Donatelli et al., 1991).

Il existe principalement deux variants antigéniques, pour le sous-type H1N1, présents chez les populations porcines. Le variant nommé "US" est présent en Amérique de Nord alors que le second variant, nommé "Europe", circule dans différents pays européens. Leur origine respective est probablement ce qui permet de différencier ces deux variants. En

effet, le variant "US" origine d'une souche porcine alors que le variant "Europe" est plutôt d'origine aviaire (Neumeier et Meier-Ewert, 1992). En ce qui concerne le sous-type H3N2, il semble qu'il soit également représenté par deux variants antigéniquement différents, dont l'un est d'origine humaine alors que l'autre origine d'espèces aviaires (Webster et al., 1993). Bien qu'on le retrouve en plus faible proportion que le sous-type H1N1, le sous-type H3N2 est présent aux États-Unis (Chambers et al., 1991), au Canada (Gagnon et al., 1974) ainsi qu'en Asie (Kida et al., 1988). Le sous-type H1N2 serait apparu au Japon chez les porcs suite à une infection mixte par deux souches virales humaines de sous-type H1N1 et H3N2. Cependant, la transmission de ce virus recombinant d'un porc à l'autre n'a fait à ce jour l'objet d'aucun rapport (Sugimura et al., 1980).

#### 2.5.2 Hôte intermédiaire

Plusieurs facteurs permettent de comprendre le rôle déterminant joué par les espèces porcines dans la transmission du virus influenza. Parmis ceux-ci il est possible d'inclure: la grande susceptibilité du porc aux infections par des souches d'influenza humaines et aviaires, la transmission directe du virus influenza d'un porc aux humains et aux espèces aviaires (Webster *et al.*, 1993) et le fait que seul le porc possède les deux récepteurs (NeuAc 2,3Gal et 2,6Gal) requis à l'attachement du virus aux cellules épithéliales (Campitelli *et al.*, 1997).

L'isolation, en 1976, d'une souche d'influenza porcin (H1N1) présente chez des recrues de l'armée américaine cantonnées à Fort Dix dans le New Jersey, a démontré la transmission possible du virus d'un porc à l'homme (Kendal et al., 1977). Depuis, plusieurs autres cas d'infection chez l'homme due au virus influenza porcin ont été répertoriés. Un virus influenza porcin antigéniquement et génétiquement identique à celui isolé à Fort Dix a également été isolé chez des porcs et des hommes habitant la même ferme au Wisconsin (Hinshaw et al., 1978). De plus, la mort d'une femme enceinte infectée par une souche d'influenza porcin a mis l'emphase sur l'apparition de souches plus virulentes à mesure que le virus traverse la barrière entre les espèces (Rota et al., 1989). Plus récemment, en 1997, un autre cas de transmission du virus influenza porcin à l'homme a été répertorié. Il s'agissait de la contamination des membres du personnel technique ay ant été en contact avec des porcs

infectés expérimentalement avec une souche d'influenza porcin (Wentworth et al., 1997).

Le virus influenza porcin (H1N1) se transmet également aux espèces aviaires par un mécanisme qui demeure jusqu'à maintenant inconnu. La présence du virus porcin a été mise en évidence suite à son isolement chez les canards sauvages au Canada (Hinshaw et al., 1978), à Hong Kong (Butterfield et al., 1978) et en Europe (Ottis et Bachmann, 1980). Bien que la localisation naturelle du virus se situe dans le tube digestif, sa présence dans le tractus respiratoire a également été démontrée de façon expérimentale. La transmission à l'homme d'une souche virale présente chez les dindes, suite à une infection par une souche porcine, a également été démontrée par Hinshaw et ses collaborateurs (1983).

La transmission naturelle aux porcs de souches d'influenza isolées chez les hommes et chez les espèces aviaires a également été démontrée. Ceci peut entraîner de fâcheuses conséquences puisqu'en permettant un réassortiment entre deux virus suite à une double infection chez le porc, cette espèce devient un bon candidat en servant d'hôte intermédiaire, pour la génération de virus recombinant pouvant être à l'origine de nouvelles pandémies (Donatelli et al., 1991). Des études réalisées par Castrucci et al. (1993) ont démontré que la souche porcine A/Swine/Hong Kong/126/82 de sous-type H3N2 est une souche recombinante provenant d'un réassortiment chez le porc entre les gènes codant pour les protéines PB1 et PA d'une souche aviaire H3N2 et ceux d'un variant humain de sous-type H3N2.

# 2.5.3 Stabilité antigénique du virus influenza porcin

Malgré sa transmission chez plusieurs espèces et le rôle possible du porc comme hôte intermédiaire du virus, des études réalisées chez des souches isolées entre 1965 et 1988 (Sheerar et al., 1989) tout comme celles réalisées entre 1986 et 1991 (Noble et al., 1993) ont permis depuis 1965 de démontrer la grande stabilité du virus influenza porcin tant au niveau antigénique que génétique. Ceci étant en grande partie attribuable à la préservation des propriétés antigéniques de la protéine HA au cours de ces années. Plusieurs chercheurs sont à la recherche d'une explication valable concernant la stabilité du virus. C'est ainsi que

certains l'expliquent par l'absence de sites de gly cosy lation dans la partie distale globulaire de la région HA1 à proximité du site anti-récepteur. En effet, l'apparition de sites de gly cosy lation suite à la pression sélective subie par la cellule-hôte pourrait modifier les propriétés antigéniques de la protéine HA en cachant des déterminants antigéniques localisés dans cette région (Inskter et al., 1993). De plus, les porcs vivent en promiscuité et ont une courte espérance de vie ce qui implique que le cycle de réplication virale est assuré par le transfert du virus parmi une population porcine très grande et composée surtout de jeunes porcs, chez qui l'immunité n'est pas très développée (Hinshaw et al., 1978), ce qui peut favoriser la stabilité du virus.

#### 2.6 Souches retrouvées au Québec

### 2.6.1 A/Sw/Québec/192/81

En 1981, il a été possible d'identifier chez les populations porcines une souche virale d'influenza de sous-type H1N1, A/Sw/Québec/192/81 (SwQc81), causant les symptômes associés au virus de la grippe classique. Cliniquement, la grippe porcine se caractérise par une baisse d'appétit, une forte fièvre (42°C), une respiration saccadée accompagnée d'une toux, un écoulement nasal et lacrymal ainsi qu'une perte de poids. La convalescence des porcs infectés par la souche SwQc81 est relativement rapide, entre 5 et 7 jours, et le taux de mortalité relié à l'infection est très bas et peu significatif (Morin et al., 1981).

# 2.62 A/Sw/Québec/5393/91

L'apparition en 1988 de maladies respiratoires chroniques a mené à l'identification d'une seconde souche d'influenza (H1N1) chez les populations porcines au Québec. Cette souche, nommée A/Sw/Québec/5393/91 (SwQc91), a par la suite été associée à la pneumonie proliférative et nécrosante (PPN) (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992b). Suite à son isolation au Québec, la PPN est apparue en Ontario (Thomson et Carman, 1991) et au Manitoba (Austin et Bystrom, 1991). Plusieurs études ont démontré qu'il existe plus d'un facteur pouvant être responsable de la PPN. En effet, le groupe de Dea et al. a démontré en 1992(b)

la présence du virus responsable de syndrome respiratoire et reproducteur (SRRP) chez les porcs affectés par la PPN. Ces études ont été corroborées par le groupe de Magar et al. qui rapportait, en 1993, l'isolation du virus SRRP à partir des poumons de porcs atteints par la PPN. En 1994, il a été possible d'isoler un variant de sous-type H3N2 du virus influenza de type A chez des porcs démontrant des signes d'infections à la PPN (Bikour et al., 1994) et depuis l'isolation de variant SwQc91, plusieurs variants du virus influenza A de sous-type H1N1 ont été isolés au Québec (Bikour et al., 1995; Arora et al., 1997a). Bien que l'influenza ne semble pas le seul agent responsable de la PPN chez les porcs présents dans la nature, il est toutefois possible de reproduire expérimentalement les lésions microscopiques associées à la maladie en inoculant, de façon intranasale, la souche du nouveau variant SwQc91 chez des porcelets gnotobiotes (Dea et al., 1992a).

Au niveau clinique, la PPN est très contagieuse et elle serait transmise dans un troupeau suite au contact entre un porc infecté et des individus sains. Cette maladie a comme principale cible les porcelets âgés de moins de 4 mois présents dans les pouponnières et les endroits réservés à l'engraissement (Girard et al., 1992). Les signes cliniques associés à la PPN sont principalement, une fièvre prolongée, une dy spnée et polypnée, une respiration abdominale et contrairement aux porcs infectés par le virus de la grippe classique, les porcs touchés par la PPN ne toussent presque pas. Le taux de mortalité chez les nouveaux-nés et les porcelets non-sevrés est élevé comparativement à celui engendré par la grippe classique (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992a). De plus, les nombreuses infections secondaires d'origine virale, bactérienne et parasitaire qui accompagnent la PPN suggèrent qu'elle affecte surtout les porcs qui sont immunodéficients (Morin et al., 1990).

Présentement il y a un manque à combler au Canada au niveau de l'immunisation des porcs contre les souches variantes associées à la PPN. Il n'existe aucun vaccin, qu'il soit conventionel ou recombinant, breveté pour la protection des porcs contre la PPN (Conseil Canadien du Porc, 1995).

#### 2.7 L'immunité

Le virus influenza, lorsqu'il infecte l'hôte, déclenche des mécanismes de défense basés sur une réponse immunitaire non-spécifique et spécifique. Afin de pouvoir infecter l'hôte, le virus doit affronter la première ligne de défense présente sur et sous la surface de l'épithélium du tractus respiratoire durant les premiers jours, suivant l'infection. Cette ligne de défense est composée des macrophages, des leucocytes polymorphonucléaires (PMNL) et des cellules "natural killer" (NK) (Sweet et Smith, 1980; Fujisawa et al., 1987). Des études réalisées chez la souris ont démontré, suite à l'administration d'un virus influenza inactivé ou traité avec un détergent, qu'il était possible de stimuler les composantes de la première ligne de défense et d'engendrer une protection contre le virus influenza (Arora, 1993). Le virus influenza est également responsable de la production de réactifs oxygénés par les macrophages et les PMNL ainsi que de l'amplification de l'activité cytotoxique des cellules NK (Arora et Henrichon, 1994; Arora et Houde, 1991; Arora et al., 1984).

L'immunité spécifique constitue le second mécanisme de défense et comprend la réponse immunitaire humorale et à médiation cellulaire. Une infection à l'influenza induit un titre élevé en Ac neutralisants dirigés contre la glycoprotéine de surface, HA, qui représente la cible majeure de la réponse humorale protectrice (Ghendon, 1990). Les Ac neutralisants se lient au virus et préviennent l'attachement de ce dernier à la cellule et leur présence est liée à la résistance des animaux et des hommes au virus. De plus, les Ac dirigés contre la protéine NA peuvent, non pas neutraliser l'infectivité du virus, mais plutôt ralentir le bourgeonnement de la particule virale, tout comme les Ac dirigés contre la protéine M2 (Zebedee et Lamb, 1988). Les Ac dirigés contre la protéine M2 recombinante peuvent également protéger contre une infection létale chez la souris (Slepushkin et al., 1995). Le processus par lequel est produit un Ac débute avec la présentation de peptides antigéniques aux cellules T, par les cellules présentatrices d'Ag, ce qui provoque la prolifération des cellules T auxiliaires. Ces cellules, en aidant les cellules B, contribuent à la formation de l'Ac (Abbas et al., 1994). Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), activées par les cytokines libérées par les cellules auxiliaires, sont impliquées dans l'immunité à médiation cellulaire ce qui constitue un autre mécanisme de défense spécifique contre le virus influenza (Abbas et al., 1994). Chez des

patients souffrant d'agammaglobulinémie et qui pouvaient récupérer d'une infection à l'influenza, ce qui laissait supposer que les Ac n'étaient les seuls à protéger contre le virus, on a pour la première fois soupçonné la présence d'une immunité cellulaire (Ghendon, 1990). Il a été démontré que les régions HA1 et HA2 de la protéine HA engendrent une immunité cellulaire cy totoxique responsable de la ly se des cellules infectées par le virus (Gould et al., 1987), tout comme le fait la protéine NA et les protéines internes M1 et NP (Wy sockam et al., 1994; Matsui et al., 1995).

#### 2.8 Protéines recombinantes

Le développement des techniques de biologie moléculaire a permis le clorage rapide des gènes du virus influenza dans des vecteurs plasmidiques. L'expression du produit de ces gènes peut se faire dans des systèmes procaryotes, ainsi que dans des systèmes d'expression eucaryotiques. Généralement, la protéine recombinante produite, par l'un ou l'autre de ces systèmes d'expression, conserve les propriétés antigéniques présentes chez la protéine native correspondante. De plus, ces protéines recombinantes peuvent induire une immunité humorale, qui implique la production d'anticorps spécifiques à certains déterminants antigéniques, ainsi qu'une immunité à médiation cellulaire, qui implique la prolifération des CTL, chez les modèles animaux et humains vaccinés avec cette dernière.

# 2.8.1 Système d'expression procary ote

Les différents systèmes utilisés pour exprimer une protéine présentent tous des avantages ainsi que des désavantages. La technique la plus populaire et la plus simple à appliquer est celle qui requiert l'utilisation de cellules compétentes provenant de souches d'E.coli. De plus, le temps nécessaire pour générer une surexpression de la protéine recombinante est relativement court. Le système d'expression procary ote est peu dispendieux et puisque la génétique de la bactérie E. coli est bien connue, il devient facile de modifier celle-ci à notre avantage. Le grand désavantage des systèmes procary otes, lors de l'expression de glycoprotéines virales, se traduit par l'absence de modifications post-traductionnelles ce qui peut mener à l'expression d'antigènes dépourvus d'épitopes de

neutralisation (Ausebel et al., 1995). De plus, il arrive que les protéines, qui sont produites en très grandes quantités dans ces systèmes, précipitent sous forme d'aggrégats insolubles dans les cellules d'E.coli, nommés corps d'inclusion (Rudolph et Lilie, 1996). Le problème des corps d'inclusion se traduit par le fait que pour les solubiliser il faut recourir à l'utilisation d'agents dénaturants, ce qui implique que la protéine dénaturée et libérée doit être renaturée afin d'être biologiquement active. Il est possible de tirer profit de la présence des corps d'inclusion dans le cas où la protéine produite sert d'antigène, au cours d'une immunisation. En effet, puisque les corps d'inclusion, contenant la protéine d'intérêt ont une masse plus élevée, il est possible de les purifier par centrifugation différentielle. Par la suite, il devient possible d'isoler, en conditions dénaturantes, la bande correspondant à la protéine d'intérêt sur un gel de polyacry lamide, et de la purifier avant de l'injecter à l'animal (Ausebel et al, 1995).

Dans la littérature, il est possible de retrouver certains exemples, dont les travaux du groupe de Watanabe et al. (1996), faisant, mention de la production de la protéine M1 dans un vecteur d'expression procary ote.

## 2.8.2 Système d'expression eucary ote

L'avantage d'utiliser un système eucary ote réside dans le fait qu'il respecte les changements post-traductionnels des gly coprotéines. Bien que les techniques utilisées pour exprimer les protéines soient plus laborieuses et engendrent des coûts plus élevés, plusieurs études ont été réalisées sur le clonage des gènes du virus influenza dans des vecteurs d'expression viraux et sur l'expression du produit de ces gènes dans des cellules eucary otiques (Ausebel et al., 1995). Parmi ces travaux il est possible de retrouver des exemples relatant l'expression de la protéine M2 dans des cellules d'insectes et impliquant l'utilisation du baculovirus comme vecteur d'expression eucary otes (Black et al, 1993a). De plus, trois nouvelles applications, dans le domaine de la prophylaxie contre le virus influenza, ont pu être développées suite à ces études. Ces applications seront discutées à la section 2.9.

La levure, telle Saccharomyces cerevisiae, est également considérée comme un système d'expression eucaryotique avec lequel il est relativement facile de produire une protéine (Kurtz et al., 1995). Il est possible de produire la protéine M2 du virus influenza chez la levure, cependant une trop grande production de protéine M2 entraîne un relentissement de la croissance de levure. Ce ralentissement s'observe également chez les cellules d'insectes (Black et al., 1993b) ainsi que chez les bactéries (Guinea et Carrasco, 1994) et il serait probablement dû à la toxicité du canal ionique, pour les cellules, qui augmente plus la quantité de protéine M2 est élevée (Kurtz et al., 1995).

#### 2.9 Vaccins

Présentement, la protection contre le virus influenza est acquise suite à une vaccination avec le virus inactivé. Bien que cette protection ait un taux d'efficacité qui se situe entre 50 et 80%, il existe des individus chez qui la vaccination n'a pas fonctionné (Kohn et al., 1995). Puisqu'il ne semble pas possible d'obtenir une protection complète suite à la vaccination avec le virus inactivé, d'autres outils ont dû être développés.

#### 2.9.1 Vaccins sous-unitaires

Les vaccins sous-unitaires tout comme ceux fabriqués avec des virus inactivés protègent contre une infection au virus influenza. Le principe du vaccin sous-unitaire repose sur l'utilisation des sous-unités recombinantes HA et NA purifiées, provenant du virus, afin d'induire une réponse humorale anti-influenza tout en éliminant les inconvénients généralement associés à l'utilisation du virus complet. L'avantage des vaccins sous-unitaires repose sur le fait qu'ils peuvent induire une immunité cellulaire cy totoxique offrant une protection contre plusieurs souches qui sont hétérologues à la souche dont on a injecté les protéines, et ce contrairement aux anticorps neutralisants dirigés contre la protéine HA. Ceci, en plus de limiter la progression de la maladie et de complémenter l'activité des vaccins traditionnels, permet la production d'un vaccin sans qu'il soit essentiel de prévoir annuellement de quelles souches il sera composé (Fries et al., 1993). Des expériences réalisées avec l'aide d'adultes consentants ont démontré qu'il était possible d'obtenir une

protection contre une dose du virus influenza de type A (H1N1), suite à l'immunisation avec une protéine recombinante du virus influenza, bien qu'aucun Ac neutralisant n'ait été détecté (Fries et al., 1993). Ces vaccins sont sécuritaires, cependant ils sont relativement dispendieux à produire, ce qui peut devenir un obstacle à une campagne de vaccination à grande échelle ou dans les pays sous-développés. C'est d'ailleurs le problème majeur que pose la vaccination contre le virus de l'hépatite B (Davis et al., 1997).

#### 2.9.2 Virus vivant atténué

Le principe visant à atténuer une souche virale a été développé, en 1796, par Edward Jenner en utilisant le virus de la vaccine présent chez les espèces bovines afin de protéger les humains contre le virus de la variole. Il a ainsi démontré qu'il était possible d'engendrer une réponse immunitaire suite à la vaccination avec un agent, similaire, mais moins pathogène que celui contre lequel on veut protéger (Jenner, 1798), tel que rapporté par Liu (1998). Plus récemment, ce principe a été appliqué pour le développement d'un vaccin impliquant l'utilisation de souches virales adaptées au froid, c'est-à-dire qui ont la capacité de se répliquer à des températures inférieures à 37°C. Ceci implique qu'elles se répliquent plus facilement dans les voies nasales, puisque la température ambiante y est plus fraîche, que dans le tractus respiratoire inférieur où elles n'auront plus la capacité de causer la maladie. Ceci permet de stimuler l'immunité mucosale et systémique sans qu'il y ait de risque d'être infecté suite à la vaccination (Maassab et DeBorde, 1985) et il semble que ce mode de vaccination soit efficace chez les enfants (Liu, 1998).

Une autre approche, basée sur l'utilisation de souches adaptées au froid, a été utilisée par le groupe de Palese (1997). Elle implique le développement d'un vaccin dans lequel ont été inclues des souches adaptées au froid et qui possèdent les gènes des protéines HA et NA provenant des souches circulant dans l'environnement, et contre lesquelles on veut immuniser les individus.

#### 2.9.3 Vecteurs viraux

Les virus atténués et les bactéries, modifiés au préalable, peuvent être utilisés comme plasmides dans lesquels il est possible d'insérer des gènes codant pour des protéines présentes chez différents agents pathogènes. Ces vecteurs permettent de stimuler le système immunitaire en utilisant seulement les gènes de l'agent pathogène, plutôt que l'agent en entier, ce qui en fait des outils de vaccination plus sécuritaires que le vaccin fabriqué avec une souche virale atténuée. Le virus de la vaccine et le virus de la variole "avipox", présents chez les espèces aviaires, sont deux exemples de vecteurs viraux couramment utilisés. L'utilisation en laboratoire du virus de la vaccine, comme vecteur viral, est très populaire puisqu'il possède plusieurs gènes qui ne sont pas essentiels à la réplication du virus (Andrew et al., 1987), il est donc possible de les remplacer et d'insérer des fragments d'ADN qui peuvent contenir jusqu'à 25 000 paires de base (pb) (Smith et Moss, 1983). De plus, il peut induire une réponse immunitaire similaire à celle induite par le pathogène dont il porte les gènes. Bien que l'immunité induite chez les individus qui ont déjà été vaccinés avec le virus de la variole soit plus faible, les médecins hésitent à utiliser ce virus comme vecteur viral et ce même si ces individus peuvent développer une immunité contre un autre agent pathogène dont le gène est contenu dans le vecteur (Jones et al., 1983; Cooney et al., 1991).

Le baculovirus est un autre vecteur viral fréquemment utilisé. Des expériences réalisées avec le gène de la protéine M2, inséré dans ce vecteur, ont démontré qu'il était possible de détecter des anticorps dirigés contre la protéine M2 dans le sérum des souris immunisées (Black et al., 1993b). Par la suite, les expériences réalisées par le groupe de Slepushkin (1995) ont démontré qu'il était possible d'obtenir une protection chez les souris, contre une infection létale par le virus influenza de type A, suite à l'immunisation avec le baculovirus exprimant la protéine M2.

Le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne (VEE) recombinant est également utilisé comme vecteur viral. Des études réalisées chez la souris, suite à l'injection souscutanée du vecteur contenant la protéine HA du virus influenza, ont démontré qu'il était possible d'obtenir des Ac spécifiques à la protéine HA qui protègent contre une infection par

le virus influenza (Davis *et al.*, 1996). Ce vecteur est intéressant puisque le VEE n'est pratiquement pas rencontré chez l'homme donc, contrairement au virus de la variole, l'absence d'une immunité pré-existante permettrait une bonne expression de l'antigène (Ag). De plus, le VEE ne se réplique que dans les tissus lymphoïdes ce qui stimulerait de façon efficace le système immunitaire (Davis *et al.*, 1996).

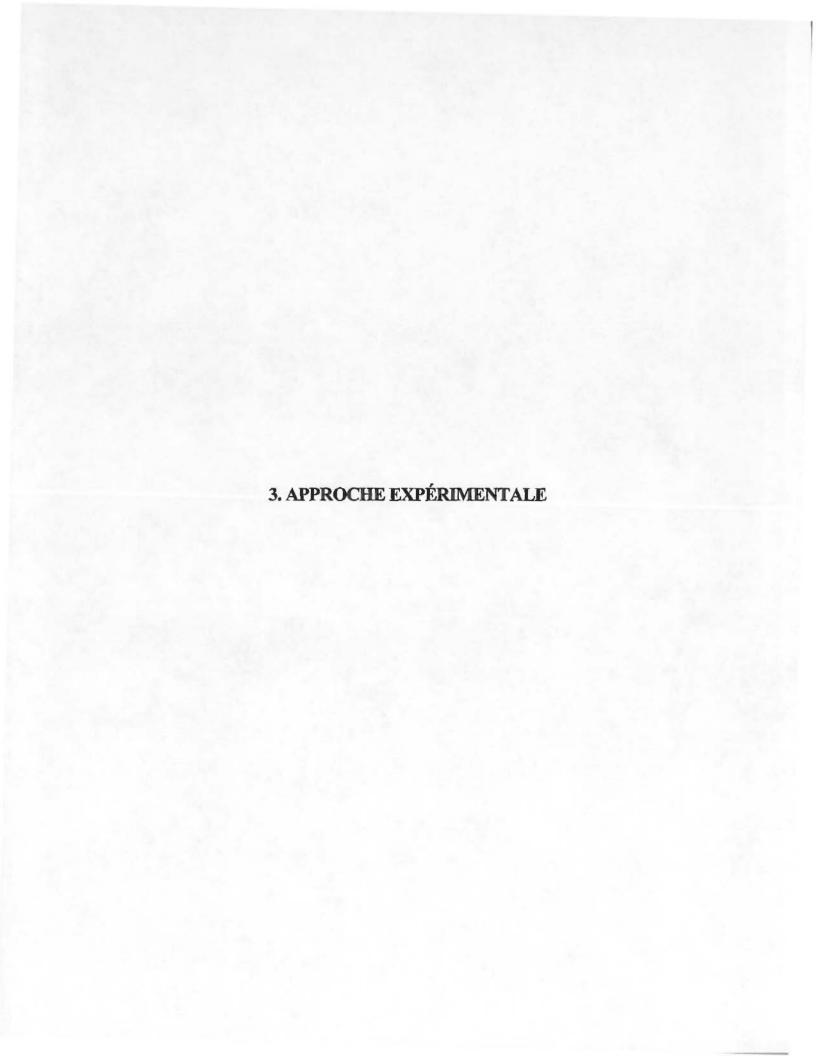
## 2.9.4 Peptides synthétiques

L'utilisation des peptides synthétiques nécessite au préalable une bonne connaissance des épitopes des protéines contre lesquels l'immunité humorale et cellulaire est dirigée (Lerner, 1983). Les peptides synthétiques sont en fait des chaînes d'aa impliquées dans la réaction Ag-Ac et ils peuvent être difficiles à générer si leurs épitopes sont conformationnels et non linéaires, comme c'est le cas pour la protéine HA du virus influenza (Wiley et al., 1981). Administrés seuls, les peptides synthétiques ont un faible pouvoir immunogène, ils doivent donc être jumelés à des adjuvants qui ont pour rôle de stimuler la réponse immunitaire. Présentement, bien qu'il y ait une grande quantité d'adjuvants disponibles, l'hydroxy de d'aluminium est le seul adjuvant dont l'ajout est permis dans les vaccins administrés chez l'homme (Liu, 1998). Récemment, des études sur le développement de nouveaux adjuvants inoffensifs pour l'homme ont mené à l'utilisation de protéosomes. Les protéosomes sont des protéines membranaires très hydrophobes présentes chez le méningocoque. Lorsque jumelés à des peptides synthétiques correspondant à des épitopes de la protéine HA du virus influenza, ils sont capables d'induire une réponse humorale et cellulaire tout en protégeant partiellement contre une infection létale du virus influenza (Levi et al., 1995).

La vaccination avec des peptides synthétiques présente plusieurs avantages. Elle est sécuritaire et contrairement aux vaccins traditionnels, il est possible d'inclure des peptides de plusieurs pathogènes dans un seul vaccin et la période d'entreposage est plus longue (Levi *et al.*, 1995).

L'immunisation à l'aide de l'ADN, ou immunisation génétique, implique l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre une protéine antigénique s'exprimant in vivo dans une cellule, suite au clonage dans un vecteur plasmidique de l'ADN purifié codant pour une séquence polypeptidique (Davis et al., 1994; Liu, 1998). L'amplitude de la réponse immunitaire engendrée semble dépendre de la quantité de protéine produite par le vecteur. L'expression de la protéine peut être influencée par le nombre de copies du vecteur qui a été transfecté dans une cellule, par le nombre d'introns présents dans le vecteur d'expression ainsi que par la distance qui sépare le promoteur, qui dirige l'expression, du gène à exprimer. Les promoteurs les plus populaires sont les promoteurs viraux et les plus couramment utilisés sont ceux du cytomégalovirus (CMV) et du virus du sarcome de Rous (Ertl et Xiang, 1996; Norman et al., 1997). Des expériences réalisées chez plusieurs modèles animaux, par exemple chez la souris (Rota et al., 1990; Montgomery et al., 1993) et le furet (Donnelly et al., 1995), ont démontré qu'il était possible, suite à l'immunisation génétique, d'engendrer une immunité protégeant contre un grand nombre de maladies. De plus, les vaccins à ADN peuvent engendrer une immunité cellulaire cytotoxique restreinte aux CMH de classe I, impliquant les CTL, tout en respectant les modifications post-traductionnelles des protéines. La combinaison des vaccins à ADN avec des adjuvants ne semble pas nécessaire puisque l'ADN agirait lui-même à titre d'adjuvant (Liu, 1998). L'immunisation génétique se fait surtout, en injectant intramusculaire le vecteur contenant l'ADN. Le mécanisme par lequel l'ADN injecté est pris en charge par les cellules musculaires est peu connu, cependant il semble que ce dernier demeure sous forme épisomale sans s'intégrer au génome de la cellule et sans se répliquer (Pardoll et Beckerleg, 1995). Son intégration possible au génome de la cellule représente tout de même un désavantage. De plus, bien que l'immunité semble de longue durée elle est longue à se développer (Ertl et Xiang, 1996). Cependant, des expériences réalisées sur le virus de l'hépatite B ont démontré qu'il était possible d'optimiser chez la souris la réponse humorale en co-injectant un vecteur exprimant des cytokines et un contenant l'ADN. En plus d'être efficace, le recours à l'immunisation génétique contre l'hépatite B s'avère moins dispendieux que la vaccination avec le vaccin sous-unitaire (Davis et al., 1997).

Des expériences, portant sur l'immunisation génétique contre le virus influenza, ont démontré qu'il était possible de produire des anticorps capables de protéger contre une infection létale d'influenza, et d'induire une immunité cellulaire cytotoxique en injectant chez la souris l'ADN codant pour la NP. De plus, les CTL produits pouvaient ly ser les cellules cibles infectées avec une souche qui est hétérologue à la souche d'où provient la NP injectée (Ulmer et al., 1993). D'autres expériences, portant sur l'immunisation génétique chez la souris et impliquant la protéine HA, ont démontré que des Ac dirigés contre cette protéine sont produits et qu'ils protègent contre une seconde infection de la souche homologue (Ulmer et al., 1994; Justewicz et al., 1995; Deck et al., 1997).



#### 3.1 Virus

#### 3.2 Souches virales

Les souches de sous-type H1N1 utilisées, A/Sw/Québec/192/81 (SwQc81) et A/Sw/Québec/5393/91 (SwQc91), ont été obtenues du laboratoire du Docteur Serge Dea, professeur-chercheur au Centre de recherche en virologie de l'IAF. La souche SwQc81 a été isolée en 1981 dans les fermes porcines du Québec au cours d'une épidémie d'influenza, chez les porcs présentant les symptômes classiques de la grippe (Morin *et al.*, 1981). Quant à la souche SwQc91, elle a été isolée chez des porcelets et des porcs dont les poumons présentaient des lésions caractéristiques de la PPN (Dea *et al.*, 1992b).

### 3.3 Culture et purification des souches virales

#### 3.3.1 Culture

Les souches SwQc81 et SwQc91 ont été cultivées dans des oeufs embry onnés de 11 jours provenant du couvoir Simetin (St-Canut, Québec, Canada). L'inoculum de chaque souche a été diluée à 2 unités hémagglutinantes par millilitre (HA/ml) dans du tampon PBS (Annexe 1, Section 1.0) et 0,2 ml de cette dilution a été inoculée par voie chorioallantoïdienne à l'aide d'une seringue 3 centimètres cubes (cc) munie d'une aiguille 23G (Fisher, Montréal, Québec, Canada), le tout réalisé sous conditions stériles. Les oeufs ont été incubés à 33°C pendant 48 heures en atmosphère humide puis transférés à 4°C pendant 18 heures. Le liquide allantoïque infecté par chacune des souches a été récolté sous conditions stériles.

#### 3.3.2 Purification

La purification du liquide allantoïdien est réalisée en deux étapes comprenant: une phase de concentration sur gradient discontinu de saccharose et une phase de purification qui se subdivise également en deux étapes requérant aussi un gradient discontinu de saccharose (Arora et al., 1985).

Lors de la concentration, les débris cellulaires sont éliminés du liquide allantoïque de l'oeuf par filtration à l'aide de laine de verre (Pyrex Fiber Glass, Corning, New York, USA). Le gradient discontinu de saccharose utilisé lors de la concentration a été préparé en ajoutant 1 ml d'une solution contenant 50% poids/poids (p/p) de saccharose ultrapure (Canadian Scientific Products, London, Ontario, Canada) dissout dans du tampon PBS contenant 0,02% de l'azide de sodium (NaN3), puis déposé dans un tube de polly allomère de 30 ml (Beckman, Toronto, Ontario, Canada) et congelé 30 secondes (sec) dans de l'azote liquide. À ce premier coussin a été ajouté un deuxième coussin de saccharose composé de 2 ml d'une solution contenant 22% de saccharose (p/p) dissout dans un tampon PBS, le tout congelé une seconde fois dans de l'azote liquide pendant 30 sec. Par la suite, un volume de 25 ml de liquide allantoïque infecté et clarifié a été ajouté dans chaque tube contenant le gradient discontinu et ultracentrifugé à 100 000 X g pendant 60 minutes (min) à 4°C dans une ultracentrifugeuse de marque Beckmann. Suite à l'ultracentrifugation le liquide allantoïque a été enlevé en laissant toutefois 1 ml au dessus du gradient afin d'éviter de perturber à la fois le gradient et les particules virales. Les tubes contenant le gradient et le liquide ont été recongelés de nouveau pendant 30 sec et un nouveau volume de 25 ml de liquide allantoïque infecté a été ajouté et le tout a été centrifugé de nouveau, tel que décrit précédemment. Les différentes manipulations ont été répétées jusqu'à l'épuisement du liquide infecté. Les gradients contenant les culots de virus concentré pour chaque souche virale ont été rassemblés et conservés jusqu'à l'étape de purification.

Préalablement à l'étape de purification, les culots ont été rassemblés et dispersés trois fois à l'aide d'un sonicateur (Sonic, dismembrator, Fisher Scientific, Farmingdale, New York, USA) utilisé à une intensité de 30 megahertzs (MHz) par seconde et clarifiés par centrifugation (centrifugeuse PR-6, IEC, Needham, Mass. USA) à 1 000 x g pendant 10 min à 4°C. La purification débute lorsque la concentration en saccharose de l'échantillon a été ajustée à 50% (p/p) avec du saccharose solide. La suspension a été ultracentrifugée à 100 000 x g pendant 90 min à 4°C. Les différentes particules qui avaient une densité plus élevée que les particules virales se sont retrouvées dans le culot alors que les particules virales sont demeurées dans le surnageant. Les surnageants ont par la suite été regroupés et leur concentration en saccharose a été ajustée à 26% (p/p) en ajoutant du tampon PBS. La

suspension a été ultracentrifugée tel que décrit précédemment. Cette fois-ci, ce sont les particules de densité inférieure à celle des particules virales qui se sont retrouvées dans le surnageant puis les différents culots contenant les particules ont ensuite été resuspendus à l'aide de tampon PBS. Puis le dosage protéique et le titre hémagglutinant ont été effectués. Le virus a également été aliquoté et entreposé à -80°C jusqu'à son utilisation ultérieure.

## 3.4 Titre de l'activité hémagglutinante

La méthode du "WHO collaborating center for reference and research on influenza (1982)" a été utilisée afin d'évaluer le titre de l'activité hémagglutinante de chaque souche virale. Un volume de 0,05ml de PBS a été déposé dans tous les puits d'une plaque de 96 puits à fond rond Linbro/Titertek (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, USA), sauf dans ceux de la première rangée dans lesquels a été déposé 0,1ml de chaque suspension virale. Des dilutions en série logarithmique en base deux ont été effectuées et un volume de 0,05ml d'érythrocytes de coq (0,5% dans du PBS) (Centre de biologie expérimentale de l'IAF) fraîchement préparés a par la suite été ajouté dans tous les puits. Le titre a été évalué après 45 min d'incubation à la température de la pièce, selon la réciproque de la plus haute dilution virale où l'on retrouve 100% d'hémagglutination. L'hémagglutination est caractérisée par la présence d'un tap is, formé par l'agglutination des globules rouges par le virus dans le fond du puit, alors que l'absence d'hémagglutination est caractérisée par la présence d'un bouton de globules rouges dans le fond du puit.

# 3.5 Dosage protéique

La concentration protéique des deux suspensions virales a été déterminée à l'aide du "BCA protein assay kit" selon les conseils du manufacturier (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA). Un volume de 1,0ml de réactif "BCA" composé de la solution A et de la solution B dans un rapport 50 : 1 (Annexe 1, Section 3.0) a été ajouté à 0,1 ml des différents échantillons à tester qui ont par la suite été incubés 30 min à 60°C, dans un bain, sous agitation constante. Parallèlement, une courbe étalon a été établie avec des quantités d'albumine sérique bovine ("bovine serum albumin", BSA, RIA Grade, Sigma, Anachemia,

Montréal, Québec, Canada) variant entre 0 et 10 microgrammes (µg). L'absorbance des différents échantillons a été lue à une longueur d'onde de 562 nanomètres (nm) à l'aide du spectrophotomètre Carry 1E, U.V-Visible (Varian, Australie). La concentration protéique de chaque souche virale a été déterminée à l'aide de l'extrapolation sur la courbe étalon de la longueur d'onde de chacune.

### 3.6 Analyse de la pureté de chaque souche virale purifiée

La pureté de chaque suspension virale a été démontrée à l'aide d'un gel de polyacry lamide en condition dénaturante, en présence de dodécy l sulfate de sodium (SDS), selon la technique de Laemmli (1970). Le système électrophorétique "Mini-Protean II Dual Slab Electrophoresis" (Bio-Rad laboratoratories, Ltd., Richmond, Californie, USA) a été utilisé selon le guide fourni par le manufacturier. Le gel d'un millimètre (mm) d'épaisseur composé d'un gel de séparation de 12% de polyacry lamide (Bio-Rad) et 0,1% SDS (Bio-Rad), préparé dans du tampon 0,375 Molaire (M) Tris-HCl (Sigma) pH 8,8, et d'un gel de tassement de 4% polyacry lamide et 0,1% SDS préparé dans du tampon 0,125 M Tris-HCl pH 6,8 (Annexe 1, Section 4.0) a été coulé entre deux plaques de verre. Un peigne de 10 puits (Bio-Rad) a été inséré entre les deux plaques. Les échantillons du virus purifié (20 11g) à analy ser ont été ajoutés à la solution dénaturante et réductrice concentrée 2 fois et composée de 0,125 M Tris-HCl (Sigma) pH 6,8, 4% poids/volume (p/v) SDS (Bio-Rad), 20% volume/volume (v/v) gly cérol (Fisher), 5% (v/v) β-mercaptoéthanol (Bio-Rad) et 0,01% de bleu de bromophénol (Sigma). Le tout a été chauffé à 100°C pendant 5 min afin d'accélérer la dénaturation des protéines, puis déposé dans les différents puits du gel de tassement à l'aide d'un embout "Prot/Elec" (Bio-Rad). La migration a été réalisée à la température de la pièce pendant 45 min en appliquant une tension de 200 volts (V) à l'aide d'un générateur de courant Bio-Rad et d'un réservoir contenant un tampon d'électrophorèse composé de 0,025 M Tris (Sigma) pH 8,3,0,192 M gly cine (Bio-Rad) et 0,1% SDS.

Suite à l'électrophorèse les protéines ont été visualisées en incubant le gel à la température de la pièce, pendant 30 min sous agitation constante, dans une solution contenant 40% (v/v) de méthanol, 10% (v/v) d'acide acétique glacial (BDH Chemicals,

Toronto, Ontario, Canada) et 0,4% (p/v) de bleu de coomassie brillant R250 (Bio-Rad), ce qui a permis de fixer et de colorer les protéines. Le gel a par la suite été décoloré à l'aide de plusieurs lavages successifs dans une solution composée de 40% (v/v) de méthanol et de 10% (v/v) d'acide acétique glacial (BDH) (Annexe 1, Section 4.0). L'évaluation des différentes masses moléculaires (Mr) des protéines virales a été faite en comparant les bandes colorées obtenues avec un marqueur composé de différentes protéines ayant des Mr se situant entre 100 et 10 kilodaltons (kDa) ("SDS-PAGE Molecular Weight Markers, low range") (Bio-Rad) et traité en conditions réductrices et dénaturantes, tel que décrit pour le virus purifié. Le marqueur était composé de la phosphory lase B provenant des muscles de lapin (97,4 kDa), de la BSA (66,2 kDa), de l'ovalbumine de l'ocuf (45 kDa), de l'anhy drase carbonique bovine (31 kDa), de l'inhibiteur de try psine de la fève de soy a (21,5 kDa) et du ly sosy me de l'ocuf (14,4 kDa).

### 3.7 Extraction de l'acide ribonucléique viral (ARNv) pour chaque souche

# 3.7.1 À partir du virus purifié

L'extraction de l'ARNv de chaque souche a effectuée selon la technique employ ée par Chomczynski et Sacchi (1987) impliquant une extraction à l'isothiocyanate de guanidine (Signa) : phénol (BDH) : chloroforme (Signa). Tout le matériel servant à l'extraction a été traité au préalable avec une solution inhibitrice de l'activité des ribonucléases composée de 0,1% de diéthy lpy rocarbonate (DEPC) (Signa). L'ARNv de la souche SwQc81 a été extrait à partir d'un volume de 0,2 ml (environ 1 milligramme (mg)) de virus purifié et concentré a été utilisé et transféré dans un eppendorf de 1,5 ml traité au DEPC, auquel a été ajouté 1 microlitre ( $\mu$ l) de RNAsine (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suisse), 0,5 ml de solution dénaturante (Solution D) composée de 4 M d'isothiocyanate de guanidine (Signa), 0,5% (p/v) de sarkosyl (Signa), 0,1 M de  $\beta$ -mercaptoéthanol préparé dans du citrate de sodium ajusté à pH 7,0 (Signa), 50  $\mu$ l d'acétate de sodium 2 M à pH 4,0 (Signa), 0,5ml de phénol saturé avec de l'eau (BDH) (Annexe 1, Section 6.0). Après avoir mélangé vigoureusement le tout, 0,1 ml d'un mélange de chloroforme : isoamyl alcool (Signa) dans un rapport 49 : 1 a été ajouté et le tout a été mélangé une autre fois. Le tube a ensuite été incubé sur glace

pendant 15 min et centrifugé à 10 000 x g, dans une centrifugeuse de table pour tube eppendorf (Eppendorf model 5415C; Brinkmann), pendant 20 min à 4°C. Par la suite, la phase aqueuse a été transférée dans un autre eppendorf de 1,5 ml traité au DEPC, puis 0,8 ml d'isopropanol (Sigma) a été ajouté et après avoir été mélangé vigoureusement, le mélange a été incubé au minimum une heure à -20°C afin de permettre la précipitation de l'ARN génomique. Suite à l'incubation, le mélange a été centrifugé à 10 000 x g p endant 20 min à 4°C et le culot d'ARN a été resuspendu avec 0,2 ml de solution D et 1,2 ml d'isopropanol, puis incubé pendant une heure à -20°C et centrifugé une seconde fois à 10 000 x g pendant 20 min à 4°C. Le culot a été lavé avec 1 ml d'éthanol 70% (v/v) et centrifugé à 10 000 x g pendant 10 min à 4°C. L'excédent d'éthanol a été éliminé en asséchant le tube sous une hotte chimique à ventilation, à la température de la pièce pendant 15 min et le culot a par la suite été resuspendu dans 20  $\mu$ l d'eau distillée traitée au DEPC, et un volume de 1  $\mu$ l de RNAsine a été ajouté après avoir analysé la quantité et la pureté de l'ARN. Pour ce faire l'ARN a été dilué 1 : 200 dans de l'eau distillée traitée au DEPC et une lecture de la densité optique a été effectuée à des longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm à l'aide du spectrophotomètre (Annexe 2).

# 3.72 À partir du liquide allantoïque

Pour ce qui est de la souche SwQc91, la même procédure a été suivie sauf en ce qui concerne les premières étapes. En effet, un volume de 3 ml de liquide allantoïque ayant un titre hémagglutinant de 512 HA/ml a été ultracentrifugé à 100 000 x g pendant 60 min, puis le culot contenant le virus a été resuspendu dans 0,2 ml de solution D et incubé sur glace pendant 10 min. Par la suite, 0,2 ml d'eau distillée traitée au DEPC a été ajouté ainsi que 0,3 ml de solution D afin de compléter le 0,5 ml requis, puis de la RNAsine a été ajoutée ainsi que de l'acétate de sodium, du phénol et un mélange de chloroforme : isoamy1 alcool. Les étapes suivantes ont été effectuées tel que décrit à la section 3.7.1.

3.8 Synthèse et amplification du gène codant pour la protéine de la matrice.

### 3.8.1 Amorces oligonucléotidiques

Les amorces oligonucléotidiques utilisées, lors de la transcription inverse (RT) et de la réaction d'amplification par polymérisation en chaîne (PCR), ont été sélectionnées à partir d'une banque de séquences de différentes protéines de la matrice du virus influenza porcin, disponibles sur une banque de données (Genebank) et synthétisées au service de synthèse d'oligonucléotides de l'IAF. La première amorce sens, nommée M/F(26-40), a été synthétisée de façon à correspondre à la partie de séquence comprise entre les nucléotides 26 et 40 (5'-GCC TCT AGA GAA TTC GAC ATG AGT/C CTT CT/CA ACC-3') alors que l'amorce anti-sens M/R(981-994) qui a été synthétisée, de façon à être l'inverse et la complémentaire de la séquence nucléotidique, s'étend de la région 981 à 994 (5'-CGG CGT ACG GAC CTC CTA TGT TGA CAA AAT-3'). Le site de restriction correspondant à l'enzyme de restriction *Eco*RI (10 unités (U)) (GibcoBRL) a été ajouté à l'extrémité 5' de l'amorce M/F(26-40) de même que celui de l'enzyme de restriction *Xho*I (10U) (GibcoBRL) a été ajouté à l'extrémité 3' de l'amorce M/R(981-994), afin de faciliter l'insertion du produit de PCR purifié représentant le gène de la protéine de la matrice dans le vecteur d'expression procary ote pET21(a) (Novagen, Madison, WI, USA) décrit à la section 3.11.

# 3.82 Réaction de transcription inverse

L'ARN génomique du segment 7 a été transcrit en acide désoxy ribonucléique complémentaire (ADNc), à l'aide de la transcriptase inverse, à partir de l'ARNv isolé selon la technique décrite à la section 3.7, et ce pour chaque souche. Environ 3  $\mu$ g d'ARNv ont été ajoutés, pour chaque souche, dans un eppendorf de 0,5 ml (Fisher) traité au DEPC et contenant 1  $\mu$ l de RNAsine (Pharmacia). Par la suite 1  $\mu$ l de l'amorce M/R(981-994) (50 picomoles/ $\mu$ l (pmol/ $\mu$ l)) ainsi qu'un volume variant d'eau distillée traitée au DEPC ont été ajoutés afin d'obtenir un volume final de 12  $\mu$ l. Le mélange a été incubé à 70°C pendant 15 min et refroidi rapidement sur glace durant 15 min, ce qui a permis de dénaturer les brins

d'ARN. Après une centrifugation de 10 sec à 10 000 x g à 4°C, 7 µl d'un mélange contenant 4 µl du tampon 5X composé: de 250 millimoles (mM) Tris-HCl pH 8,3, de 375 mM KCl et de 15 mM MgCl₂ (GibcoBRL) ainsi que de 2 µl de 0,1 M de dithiothréitol (DTT) (GibcoBRL) et 1 µl de 10 mM d'un mélange de quatre déoxynucléotides triphosphates (dNTP) (GibcoBRL), ont été ajoutés. Une incubation de deux minutes à 42°C a été effectuée et 1 µl de Superscript Il (200U) (GibcoBRL) a été ajouté. Le mélange a été incubé pendant 50 min à 42°C et l'enzy me a par la suite été inactivée en incubant le tube à 70°C pendant 15 min. Le tube a été centrifugé à 10 000 x g pendant 10 sec suite à une incubation sur glace durant 15 min. L'ADNc produit pour chaque souche a été utilisé pour la réaction de PCR. La réaction de RT a été répétée à trois reprises.

### 3.83 Amplification par PCR de l'ADNc de la protéine de la matrice

Les produits requis ont été ajoutés dans l'ordre suivant: 77,5 ul d'eau distillée, 10 ul de tampon PCR 10X contenant 200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl (Boeringher Mannheim), 3 ul de MgCb 50 mM (GibcoBRL), 2 ul d'un mélange de 10 mM dNTP, 2,5 ul de chaque amorce M/F(26-40) et M/R(981-994), 2 µl de l'ADNc de chaque souche, et de chacune des réactions de RT et 0,5  $\mu$ l d'ADN Taq polymérase (5U/ $\mu$ l) (GibcoBRL). Au 100 ul de volume réactionnel a été ajouté un volume de 100 ul d'huile minérale légère (Sigma) afin de prévenir l'évaporation de l'échantillon. Les différents tubes ont été placés dans un thermocy cleur (MiniCy cler, Perkins) afin de subir 35 cy cles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 45 sec à 95°C, une hy bridation de 1 min à 55°C, une extension de 1 min à 72°C et une étape d'extension finale au dernier cycle de 10 min à 72°C. Les échantillons ont été refroidis à 4°C avant d'être analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Au total, un volume de 10 ul de chaque échantillon a été dilué dans 2 ul du tampon échantillon 6X et ajouté dans un puit d'un gel de 0,8% (p/v) d'agarose ultrapure dissout dans du tampon TAE 1X (Annexe 1, Section 7.0). Puis afin d'identifier les bandes des fragments d'ADN obtenues et d'en estimer la longueur, un marqueur (1 kilobase (Kb) DNA ladder) (GibcoBRL) contenant plusieurs fragments de longueurs différentes a été ajouté. Les échantillons ont migré pendant 40 min en appliquant une tension de 90 V à l'aide d'un

générateur de courant Bio-Rad et le gel a par la suite été coloré dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 mg/ml) (Annexe 1, Section 7.0) (Sigma) pendant 40 min, sur une plaque rotative. Le gel a ensuite été exposé aux rayons ultraviolets (UV) à l'aide d'un transilluminateur FBTIV (Fisher) permettant de visualiser les bandes.

### 3.9 Clonage du gène de la protéine de la matrice

## 3.9.1 Purification des produits d'amplification

Les produits d'amplification décrits à la section 3.8.3 ont été purifiés à l'aide de la trousse "Geneclean kit" (Bio101, Vista, CA, USA). La méthode employée a été celle suggérée par le manufacturier. Brièvement, un volume de 30 ul du produit d'amplification, auquel un volume de 6 ul du tampon échantillon 6X a été ajouté, a été déposé dans le puit d'un gel d'agarose de 0,8% (p/p) et a été soumis aux conditions électrophorétiques décrites à la section 3.83. Suite à une coloration de 60 min au bromure d'éthidium, le gel a été visualisé aux UV à 254 nm. Le fragment correspondant à l'ADNc de la protéine de la matrice (M) a par la suite été excisé du gel d'agarose 0,8% à l'aide d'un scalpel et transféré dans un tube eppendorf de 1,5 ml pré-pesé. Par la suite, 3 volumes (ul) d'une solution stock d'iodure de sodium (NaI) ont été ajoutés au tube et celui-ci a été incubé à 55°C pendant 5 min ou jusqu'à dissolution complète de l'agarose (entre 5 et 7 min). Un volume de 5  $\mu$ l de billes de silice (Glassmilk) a été ajouté et incubé 5 min à la température de la pièce tout en mélangeant à chaque min. Le tube a par la suite été centrifugé pendant 10 sec à 10 000 x g, après décantation les billes ont été resuspendues dans 0,3 ml d'une solution de lavage (New Wash) maintenue à une température de -20°C. Le tube a de nouveau été centrifugé 10 sec à 10 000 x g et deux autres lavages ont été effectués. Le fragment d'ADNc a été élué en resuspendant les billes dans 5 µl d'eau distillée à 55°C et en incubant le tube à 55°C pendant 2 à 3 min. Suite à une centrifugation de 30 sec à 10 000 x g, le surrageant contenant l'ADNc a été transféré dans un tube eppendorf de 0,5 ml. L'ADNc a été élué une seconde fois avec un autre volume de 5 ul pour un total de 10 ul.

### 3.92 Clonage du gène de la protéine de la matrice

Le clonage des produits d'amplification purifiés pour chaque souche virale a été réalisé dans le vecteur pCR2.1 (Invitrogen, Co, San Diego, CA). Ce vecteur présentait aux extrémités 5' des bases thy midines libres ce qui a facilité le clonage, puisque les produits d'amplification contenaient une adénosine supplémentaire à l'extrémité 3' ajoutée par l'ADN Taq polymérase lors de la réaction de PCR. La réaction de ligation a été réalisée en ajoutant, dans un tube eppendorf de 0,5 ml, 50 nanogrammes (ng) du vecteur pCR2.1, approximativement 50 ng du fragment d'ADNc purifié, 1 μl de tampon de ligation 10X (60 mM Tris-HCl pH 7,5; 60 mM MgCb; 50 mM NaCl; 1 mg/ml de BSA; 70 mM β-mercaptoéthanol; 1 mM d'adénosine triphosphate (ATP); 20 mM DDT et 10 mM de spemidine), 1 μl (8U Weiss) de l'enzy me ligase à ADN du phage T4 et un volume d'eau distillée stérile requis pour compléter le volume à 10 μl. Le tube a ensuite été incubé pendant 16 heures à 14°C. Les produits de ligation ont par la suite été conservés à -20°C jusqu'à leur transformation.

# 3.9.3 Transformation dans les bactéries compétentes $Inv_{\alpha}F$

La transformation des produits ligués dans le vecteur pCR2.1 a été réalisée en utilisant des bactéries compétentes d'*E. coli*, (Inv $_{\alpha}$ F One Shot <sup>TM</sup>) (Invitrogen, Co, San Diego, CA). Le protocole utilisé a été celui foumi par le manufacturier. Dans un tube contenant 50  $\mu$ l de cellules compétentes "One Shot <sup>TM</sup>" (Inv $_{\alpha}$ F) et conservé sur glace a été ajouté 2  $\mu$ l de 0,5 M ß-mercaptoéthanol ainsi que 2  $\mu$ l du produit de ligation. Suite à une incubation de 30 min, le tube a été transféré dans un bain à 42°C pendant 30 sec, afin de causer un choc thermique, puis incubé rapidement sur glace pendant 2 min. Un volume de 450  $\mu$ l d'un milieu SOC (2% (p/p) try ptone (Difco), 0,5% (p/p) extrait de levure (Difco), 10 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl $_{\alpha}$ . 6H2O (BDH), 20 mM de glucose (BDH) pH 7,0), décongelé au préalable et maintenu à la température de la pièce, a ensuite été ajouté au tube. Le tube a par la suite été incubé à l'horizontal, et sous agitation constante (250 rotations par min (rpm)), pendant 90 min dans un incubateur à 37°C. Des volumes de 100  $\mu$ l

et  $200\,\mu$ l du produit de transformation ont été étalés sur des boîtes de pétri contenant 20 ml d'un milieu 2xYT (1,6% (p/v) de tryptone, 1% d'extrait de levure, 0,5% (p/v) de NaCl, pH 7,0) supplémenté de 1,5% (p/v) d'agar noble (Difco) (Annexe 1, Section 9.0) et de  $100\,\mu$ g/ml d'ampicilline (GibcoBRL) et solidifié. Les cellules transformées ont été sélectionnées après une croissance de 18 heures dans un incubateur à 37°C.

## 3.9.4 Criblage des colonies possédant le plasmide et l'insert

Les cellules transformées ay ant résisté à l'antibiotique ont été rep iquées dans 2 ml de milieu 2xYT contenant de l'ampicilline et elles ont été mises en culture pendant 18 heures à 37°C, sous agitation constante. Par la suite, la technique du "boiling miniprep", telle que décrite dans "Short protocols in Molecular Biology (1992)", a été utilisée afin d'isoler les plasmides. En résumé, la suspension bactérienne a été centrifugée pendant 2 min à 10 000 x g et le culot a été resuspendu avec un mélange contenant 0,3 ml de milieu STET (0,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma); 50 mM EDTA pH 8,0; 50 mM Tris-HCl, pH 7,5), 20  $\mu$ l de ly sozy me (10 mg/ml dans 50 mM Tris-HCl pH 8,3) et 3  $\mu$ l de RNase (1 mg/ml dans de l'eau stérile) (Annexe 1, Section 8.0). Le tout a été incubé 5 min à la température de la pièce puis bouilli pendant 2 min à 100°C dans un bain-marie. Après une centrifugation de 5 min à 10 000 x g, le culot a immédiatement été enlevé à l'aide d'un cure-dent et le surnageant a été précipité avec 0,3 ml d'isopropanol 75%/2,5 M d'acétate d'ammonium. Le surrageant a par la suite été aspiré après une centrifugation de 5 min à 10 000 x g puis le culot a été lavé avec de l'éthanol 70% froid (-20°C) et centrifugé de nouveau pendant 5 min à 10 000 x g. Une fois le surnageant enlevé, l'excédent d'éthanol a été évaporé sous une hotte chimique à ventilation pendant 20 min puis le culot a été resuspendu dans 50 ul d'eau distillée. L'ADN plasmidique isolé a été digéré avec l'enzyme de restriction EcoRI afin de vérifier la présence de l'insert. Dans ce but, 2  $\mu$ l d'ADN plasmidique et 8  $\mu$ l d'eau distillée ont été déposés dans un tube eppendorf de 0,5 ml auquel ont été ajoutés 2 ul de tampon "React 3" 10X (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M MgCb; 1 M NaCl) (GibcoBRL), 1 ul (10U) d'enzyme EcoRI (GibcoBRL) ainsi que 7 ul d'eau distillée, afin de compléter le volume à 20 ul. Ce mélange a été incubé pendant 60 min à 37°C puis les colonies positives ont été sélectionnées suite à la migration électrophorétique, selon la technique décrite à la section 3.8.3.

### 3.10 Séquençage

Pour chaque souche virale, trois colonies positives (C5, C11 et C17), provenant de trois clorages différents, ont été choisies au hasard pour séquencer le gène correspondant à la protéine M. L'ADN plasmidique de ces six colonies a été purifié par ly se alcaline à l'aide de la trousse "Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification System" (Promega, Madison, WI, USA) selon la technique décrite par le manufacturier, mais à laquelle quelques modifications ont été apportées. Les six colonies ont été mises en culture dans 10 ml de milieu 2xYT supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline puis elles ont été incubées 18 heures à 37°C, sous agitation constante. Par la suite les suspensions bactériennes ont été transférées dans 6 tubes eppendorfs de 1,5 ml puis centrifugées pendant 2 min à 10 000 x g. Cette étape a été répétée jusqu'à l'épuisement du 10 ml, pour chaque colonie. Les culots bactériens ont été resuspendus dans 0,4 ml de tampon de resuspension composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA et de 100 µg/ml RNase A. Par la suite, 0,4 ml d'une solution de lyse composée de 0,2 M NaOH et de SDS 1% (p/v) a été ajoutée et les tubes ont été mélangés par inversion jusqu'à ce que la suspension devienne claire. Immédiatement après, 0,4 ml d'une solution de neutralisation composée de 1,32 M d'acétate de potassium pH 5,1 a été ajouté puis les tubes ont été mélangés par inversion et centrifugés pendant 5 min à 10 000 x g à la température de la pièce. Le surnageant de chacun des tubes (environ 1,2 ml) a été transféré dans un tube de 10 ml auquel 1 ml de résine a été ajouté (faire un tube à la fois) afin de permettre l'adsorption de l'ADN plasmidique. Après avoir mélangé à une ou deux reprises le contenu des tubes, à l'aide d'une pipette automatique (Gilson) de 1 ml, le tout a été transféré dans une seringue de 3 ml (Fisher) à laquelle était rattachée une mini-colonne fournie par le manufacturier. La résine a par la suite été lavée avec 2 ml d'une solution de lavage composée de 80 mM d'acétate de potassium, de 40 micromoles (µM) d'EDTA, de 8,3 mM de Tris-HCl pH 7,5 et de 55% (v/v) d'éthanol (Annexe 1, Section 9.0). Les minicolonnes ont ensuite été placées sur un tube eppendorf de 1,5 ml puis centrifugées pendant 2 min à 10 000 x g à la température de la pièce, afin d'éliminer l'excédent de la solution de

lavage. Finalement, un volume de 50  $\mu$ l d'eau distillée chauffée à 55 °C a été ajoutée dans la mini-colonne afin d'éluer l'ADN plasmidique. Ce dernier a par la suite été récolté, dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml, après une centrifugation de 30 sec à 10 000 x g à la température de la pièce. Suite aux manipulations précédentes, un volume final d'environ 0,3 ml contenant l'ADN plasmidique a été obtenu pour chaque colonie. L'ADN plasmidique ( $\mu g/m$ l) a été quantifié par dosage à une longueur d'onde de 260 nm (Annexe 2) et sa pureté a été analy sée sur un gel d'agarose de 0,8 % (p/v) (voir section 3.8.3 pour les conditions électrophorétiques).

L'ADN plasmidique purifié provenant des colonies a été séquencé par le service de séquençage de l'IAF. Le séquençage a été réalisé avec un séquenceur automatique "ALF" (Automated Laser Fluorescent DNA sequencer; Pharmacia Biotech) à l'aide de la méthode de Sanger, basée sur l'ajout, à l'aide de l'enzy me T7 DNA polymérase (Pharmacia Biotech), de didéoxinucléotides permettant la synthèse de la chaîne d'ADN. L'amorce universelle sens du phage M 13 située en amont des sites de restriction EcoRI du vecteur et l'amorce anti-sens du promoteur SP6, située en aval, ont été utilisées. Une amorce supplémentaire anti-sens a également été utilisée afin de compléter la séquence du gène de la protéine M. Cette amorce a été synthétisée selon la même approche que les amorces qui ont servi pour les réactions de RT et de PCR décrites aux sections 3.8.2 et 3.8.3. Cette amorce nommée M/R (721-742): 5'-GGC CTG TAA ATT TTC C/AA GAA GA-3' a été synthétisée par le service d'oligonucléotides de l'IAF. L'araly se et la traduction de la séquence nucléotidique en acides aminés ont été possibles grâce au programme Geneworks 2.2 (Intelligenetics Inc., Mountain View, CA, USA). Les différences observées, entre SwQc81 et SwQc91, au niveau des séquences nucléotidiques et au niveau des acides aminés ont été comparées.

# 3.11 Sous-clonage du gène de la protéine de la matrice dans le vecteur d'expression pET21(a)

L'insert d'ADNc (voir section 3.9.2) correspondant au gène de la protéine M, pour la souche SwQc91, a été digéré à l'aide des enzymes de restriction *Eco*RI et *Xho*I et sous-cloné dans le vecteur d'expression procaryote pET21(a) afin de produire la protéine M1 recombinante (PMR).

### 3.11.1 Digestion et purification de l'insert et du vecteur

Le vecteur pET21(a) ainsi que trois plasmides recombinants, pCR2.1-M91 (C5, C11, C17) ont été digérés à l'aide des enzymes de restriction *Eco*RI (10U) (GibcoBRL) et *Xho*I (10U) (GibcoBRL). Dans ce but, 20 μl d'ADN plasmidique ont été ajoutés dans un eppendorf de 0,5 ml ainsi que 2 μl de tampon 10X réactif 2 (0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 0,1 M MgCl<sub>2</sub>; 0,5 M NaCl) (GibcoBRL), puis 6 μl d'eau distillée et 1 μl de chaque enzyme de restriction. Les réactifs ont été incubés pendant 60 min à 37°C et par la suite, un volume de 6 μl de tampon échantillon 6X a été ajouté aux différents eppendorfs. Ce mélange a par la suite été soumis aux mêmes conditions électrophorétiques décrites à la section 3.8.3. Après coloration au bromure d'éthidium, les fragments d'ADN linéarisés, correspondant au gène de la protéine M (1027 paires de bases (pb)) et au vecteur pET21(a) (5443pb), ont été excisés du gel et purifiés à l'aide de la trousse Geneclean, selon les indications du manufacturier.

### 3.11.2 Clonage du fragment M91 dans le vecteur pET21(a)

La réaction de ligation a été effectuée selon les indications du manufacturier. Le mélange réactionnel composé de 2  $\mu$ l (60 ng) de vecteur linéarisé, de 3  $\mu$ l (60 ng) de chaque clone (M91-C5, C11 et C17), de 1  $\mu$ l de tampon (10X) de ligation, de 3  $\mu$ l d'eau distillée et de 1  $\mu$ l d'enzy me ADN T4 ligase, a été déposé dans des tubes eppendorfs de 0,5 ml. Les réactifs ont été incubés à 14°C pendant 18 heures et le mélange a par la suite été entreposé à -20°C jusqu'à l'étape de transformation.

# 3.11.3 Transformation dans les bactéries Escherichia coli BL21(DE3)

Les bactéries ont tout d'abord été rendues compétentes à l'aide du chlorure de calcium, selon la méthode de Cohen et al. (1972). Dans ce but, les bactéries non-compétentes ont été préalablement étalées sur un pétri, contenant du milieu 2xYT et de l'agar sans antibiotique, le tout a ensuite été incubé pendant 18 heures dans un incubateur dont la température a été maintenue à 37°C. Par la suite, une colonie isolée a été remise en culture

dans 2 ml de milieu 2xYT sans antibiotique puis incubée sous agitation constante à 37°C pendant 18 heures. Un volume de 100  $\mu$ l de culture bactérienne a été transféré stérilement dans un volume de 100 ml de milieu 2xYT sans antibiotique, préalablement déposé dans un erlenmeyer de 500 ml, puis le flacon a été incubé jusqu'à ce que l'absorbance prise à une densité optique de 600 nm atteigne entre 0,4 et 0,5, ce qui correspond à la moitié de la phase de croissance logarithmique soit environ 2,0 X  $10^8$  cellules/ml. La culture bactérienne a par la suite été déposée dans deux tubes coniques de propy lène de 50 ml (Fisher) refroidis sur glace qui ont par la suite été centrifugés à 1 000 x g pendant 15 min à 4°C. Le culot a été resuspendu délicatement dans 10 ml de 0,1 M de CaC $_b$  préalablement stérilisé et refroidi, puis incubé sur glace pendant 30 min. Le mélange a de nouveau été centrifugé à 1 000 x g pendant 15 min à 4°C et le culot a de nouveau été resuspendu dans 2 ml de 0,1 M de CaC $_b$ . Les bactéries ont été aliquotées en volume de 0,2 ml dans des eppendorfs de 1,5 ml et le surplus a été congelé rapidement dans un mélange de méthanol : glace sèche et finalement les tubes ont été entreposés à -80°C.

Pour la transformation, un volume de 2  $\mu$ l de chaque produit de ligation (voir section 3.9.2) a été ajouté à un tube contenant 0,2 ml de bactéries compétentes BL21(DE3) et 1  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Par la suite, les étapes décrites à la section 3.9.3 ont été répétées. Finalement, trois volumes (50, 100 et 200  $\mu$ l) de chaque produit de transformation ont été étalés sur un pétri d'agar contenant du milieu 2xYT avec l'antibiotique carbeniciline (100  $\mu$ g/ml) (Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Sola, CA, USA) puis les pétris ont été incubés pendant 18 heures à 37°C (Annexe 1, Section 10.0).

# 3.11.4 Sélection des colonies exprimant la protéine M1 recombinante

Parmi les colonies obtenues certaines ont été remises en culture dans 2 ml de milieu 2xYT avec antibiotique, sous agitation constante pendant 18 heures à  $37 \circ C$  et repiquées sur un pétri d'agar composé de milieu 2xYT avec antibiotique permettant d'identifier les colonies à l'aide d'un numéro. Après l'incubation, un volume de  $200 \, \mu l$  de chaque culture bactérienne a été transféré dans 1,8 ml de milieu 2xYT avec antibiotique frais. Les tubes ont été incubés à

37°C sous agitation constante, jusqu'à ce que l'absorbance prise à une densité optique de 600 nm se situe entre 0,6 et 0,8. Par la suite, un volume de 20 ul d'une solution de 100 mM d'isopropy I-B-D-thiogalactoside (IPTG) (GibcoBRL) (molarité finale de 1 mM) a été ajouté au 2 ml de milieu et le tout a été incubé pendant 4 heures à 37°C, sous agitation constante. L'induction a été stoppée en plaçant immédiatement les tubes dans de la glace et en ajoutant 20 µl d'une solution de 100 mM de phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF) (Sigma) (Annexe 1, Section 10.0) à tous les tubes, afin d'inhiber l'activité des protéases cellulaires. Les échantillons ont été transférés dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml qui ont été centrifugés pendant 2 min à 10 000 x g à 4 °C. Le culot a par la suite été resuspendu dans 0,3 ml de PBS et afin d'identifier les colonies exprimant la protéine, un volume de  $20~\mu l$  de chaque échantillon a été prélevé et ajouté à 20  $\mu$ l du tampon échantillon 2X. Après une incubation de 5 min à 100°C suivie d'une centrifugation de 5 min à 10 000 x g, un volume de 30 µl de chaque échantillon a été déposé dans les puits d'un gel de polyacry lamide SDS-PAGE formé d'un gel de séparation de 12% et d'un gel de tassement de 4%. Les conditions électrophorétiques utilisées ont été les mêmes que celles décrites à la section 3.6, tout comme les étapes menant à la visualisation de la protéine. Les colonies (C5, C24 et C28) qui exprimaient une protéine d'environ 28 kDa ont été sélectionnées comme étant des colonies positives.

## 3.11.5 Solubilisation des corps d'inclusion des bactéries BL21(DE3)

Afin de vérifier si la protéine exprimée était retenue dans les corps d'inclusion de la bactérie, chaque échantillon resuspendu dans 0,3 ml de PBS et sélectionné comme étant positif a été soniqué trois séries de 10 sec à 30 MHz. Le tout a été centrifugé 2 min à 10 000 x g, à la température de la pièce. Le surnageant de chaque échantillon a ensuite été déposé dans un second tube eppendorf de 1,5 ml, alors que le culot a été resuspendu dans 100  $\mu$ l de tampon échantillon. Un volume de 30  $\mu$ l du surnageant a été mélangé avec un volume égal de tampon échantillon et le culot et le surnageant de chaque échantillon ont été incubés simultanément pendant 5 min à 100°C puis centrifugé à 10 000 x g pendant 2 min, à la température de la pièce.

Les échantillons ont été analysés sur un gel de polyacry lamide 12% (voir les conditions électrophorétiques décrites à la section 3.6). La protéine a été libérée des corps d'inclusion de la bactérie à l'aide d'un traitement, composé de 100  $\mu$ l de tampon échantillon 2X auquel a été ajoutée une quantité de 100 mM de Tris-HCl pH 7,5, suivi d'une incubation de 30 min à 50°C (Annexe 1, Section 11.0). Après une centrifugation de 2 min à 10 000 x g le surnageant a été déposé dans un autre tube eppendorf de 1,5 ml et le culot a été resuspendu dans 100  $\mu$ l de tampon échantillon. Une seconde analyse électrophorétique sur un gel de polyacry lamide de 12% a été effectuée.

### 3.11.6 Cinétique d'expression

Afin d'évaluer les conditions optimales d'expression de la PMR, une cette dernière a tout d'abord été induite à différentes températures. La suspension bactérienne d'une colonie positive (C24) a été ajoutée à 2 ml de milieu 2xYT contenant un antibiotique puis incubée à 25°C, 30°C, 33°C ou 37°C dans 1 mM d'IPTG pendant 4 heures. Elle a par la suite été incubée dans 0,25, 0,5, 0,75 et 1 mM d'IPTG pendant 4 heures à 37°C. Par la suite, la même colonie positive a été induite, dans des tubes de verre de 10 ml contenant 2 ml de milieu 2xYT avec antibiotique, à différents temps d'expression: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20 et 24 heures. Pour fin de comparaison, l'analy se a été effectuée en utilisant la même quantité de protéines totales pour chaque tube. Dans ce but, la concentration de chaque échantillon a été évaluée à l'aide de la trousse "BCA protein assay kit" selon la technique décrite à la section 3.5.

# 3.12 Électroélution et dialy se de la protéine M1 recombinante

Après avoir solubiliser et évaluer les conditions optimales d'expression de la PMR, cette dernière a été produite en grande quantité dans un volume de 200 ml de milieu 2xYT avec antibiotique contenu dans un erlenmeyer de 500 ml. Elle a par la suite été purifiée par électroélution de la bande, correspondant au poids moléculaire de la protéine, puis exicée d'un gel de polyacry lamide SDS-PAGE.

### 3.12.1 Production de la protéine M1 recombinante

Les conditions décrites à la section 3.11.4 ont été appliquées. Cependant, les volumes d'IPTG et de PMSF (1 mM final) ont été ajustés en fonction du nouveau volume de production. La protéine a par la suite été solubilisée.

## 3.12.2 Électroélution et dialy se

Un volume de 1 ml, composé de 0,5 ml de suspension bactérienne contenant la protéine et 0,5 ml du tampon échantillon 2X, a été déposé dans le puit d'un peigne formé d'un petit puit réservé au marqueur de Mr et d'un second puit plus large dans lequel a été déposé l'échantillon à éluer. Après migration, selon les conditions électrophorétiques décrites à la section 3.6, les extrémités du gel contenant le marqueur et une partie de l'échantillon ont été découpées à l'aide d'un scalpel, puis colorées, selon la technique décrite à la section 3.6. Les extrémités ont été remises en place sur le gel et la bande correspondant à la protéine recombinante a été excisée du gel. Les bandes de protéines ont été conservées dans du PBS à 4°C jusqu'à l'électroélution.

Les protéines ont été éluées dans le système de Bio-Rad modèle 422 (Bio-Rad) composé d'un support pouvant contenir 6 tubes de verre et auquel était relié une électrode. L'extrémité inférieure de chaque tube a été bloquée à l'aide d'un "fritz" (Bio-Rad) puis un adaptateur en caoutchouc, auquel a été fixé une membrane à dialyse (Bio-Rad), y a été installé. Un tampon électrophorétique composé de 0,192 M de glycine (Bio-Rad) et 0,025 M Tris pH 8,3 (Annexe 1, Section 12.0) a été utilisé pour la chambre supérieure et inférieure du système, afin de permettre au courant de passer. Du tampon a été ajouté dans chaque tube ainsi que dans l'espace séparant le "fritz" et le sac à dialyse. Les bandes de protéines excisées ont été découpées en petits morœaux qui ont été placés dans chaque tube à raison de 1 cm d'épaisseur maximum par tube.

L'électroélution s'est effectuée à 4°C pendant 18 heures, en appliquant un courant de 50 V. La solution contenue dans la chambre inférieure du système a été constamment agitée

par un barreau métallique alimenté par un générateur de courant Buchler. Suite à l'électroélution, la protéine a été concentrée à 4°C, à l'aide de l'appareil Speed-Vac (Savant, Farmingdale, NY, USA) à raison de 0,5 ml par tube eppendorf de 1,5 ml et ce pendant 3 heures. Le contenu des tubes a été transféré dans des sacs à dialy se de porosité de 12-14 kDa (Spectra/Por, Spectra medical industrie, LA, USA) afin d'éliminer l'excédent de détergent, dû à l'utilisation de SDS, lors de la concentration. Les échantillons ont été dialy sés deux fois pendant 60 min et une dernière fois pendant 18 heures en présence d'un tampon composé de 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 à 4°C. La dialy se s'est effectuée dans un erlenmey er de 2 litres avec agitation constante à l'aide d'un barreau métallique alimenté par un générateur de courant Buchler. Par la suite le tampon a été remplacé par un nouveau tampon composé cette fois de 0,008 M de Tris-HCl pH 7,5 (Annexe 1, Section 12.0) puis les échantillons ont été dialy sés selon la technique décrite précédemment. Après dialy se, la pureté des échantillons a été analy sée sur un gel de polyacry lamide de 12% et la quantité de protéine purifiée a été évaluée en mesurant l'absorbance prise à une densité optique de 280 nm.

# 3.13 Purification de la protéine M1 native

La protéine M1 native provenant du virus SwQc91, purifié selon la technique décrite à la section 3.3, a été utilisée. La pureté de la protéine M1 a été analy sée de la même façon que la souche virale purifiée (section 3.6). Par la suite, un volume de 1 ml, composé cette fois-ci de 0,5 ml de virus purifié et de 0,5 ml du tampon échantillon 2X, a été utilisé. La bande correspondant à une Mr de 28 kDa a été excisée du gel et électroéluée selon la technique décrite à la section 3.12.2. Par la suite, la protéine M1 native électroéluée a été dialy sée (section 3.12.2) et la quantité de protéine purifiée a été évaluée en mesurant l'absorbance prise à une densité optique de 280 nm.

# 3.14 Étude de l'antigénicité de la protéine M1 recombinante

La réactivité de la PMR contre un sérum polyclonal anti-SwQc91 et contre 5 AcMo (fournis par le docteur Zipping Ye du NIH), a été étudiée en utilisant la technique d'immunobuvardage de type "Western" (Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981). Cette

technique se divise en deux étapes. La première consiste en un transfert électrophorétique des protéines, séparées sur un gel SDS-PAGE, sur une membrane alors que la seconde implique un immunobuvardage faisant appel à l'utilisation d'Ac primaires et secondaires.

#### 3.14.1 Transfert électrophorétique

Les échantillons suivants ont été utilisés lors du transfert électrophorétique: deux témoins négatifs (la suspension bactérienne non-exprimée et le vecteur contenu dans la suspension bactérienne et exprimé 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG), un témoin positif représenté par le virus SwQc91 purifié (section 3.3) ainsi que l'échantillon à tester, représenté par la suspension bactérienne contenant la PMR exprimée 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG. Dans le cas des expériences réalisées avec les AcMo, le témoin positif était représenté par la protéine M1 native purifiée et électroéluée (section 3.13).

Un volume de 30  $\mu$ l, composé de 15  $\mu$ l de l'échantillon et de 15  $\mu$ l du tampon échantillon 2X, a été déposé dans un tube eppendorf de 1,5 ml qui a par la suite été chauffé à 100 °C pendant 5 min. Suite à une centrifugation de 5 min à 10 000 x g, un volume de 15  $\mu$ l du surnageant de chaque échantillon a été déposé, à l'aide d'une pipette automatique "Pipetman P200" (Gilson) et d'un embout "Prot/Elec" (Bio-Rad), dans les puits de deux gels de polyacry lamide de 12%. Un volume de 4  $\mu$ l d'un marqueur de Mr, "SDS-PAGE Molecular Weight Markers low range : 100-10 kDa" (Bio-Rad), a été préparé en ajoutant dans un tube eppendorf de 0,5 ml: 8  $\mu$ l du marqueur, 22  $\mu$ l d'eau distillée et 30  $\mu$ l de tampon échantillon 2X. Le marqueur a été ajouté au puit du gel SDS-PAGE, après avoir été bouilli et centrifugé. Les conditions électrophorétiques ont été appliquées suivant la technique décrite à la section 3.6. Cependant, un seul gel a été coloré.

Le second gel SDS-PAGE a été conservé à 4°C dans 30 ml de tampon de transfert (20% (v/v) méthanol, 0,192 M gly cine (Bio-Rad), 0,025 M Tris (Sigma) pH 8,3) pendant 30 min. Parallèlement, une membrane de polyviny lidène (PVDF) "Immobilon" (Millipore, Bedford, MA, USA) de 0,45 micromètre (µm) de porosité a été activée dans 10 ml de

méthanol 100% pendant quelques sec et placée immédiatement dans 10 ml d'eau distillée. Après quelques sec, la membrane a été ré-équilibrée 10 min dans le même tampon de transfert que le gel. Deux papiers filtres #3 (Whatmann) ont également été saturés dans le tampon de transfert pendant quelques min. Une fois les incubations terminées, le transfert électrophorétiques des protéines sur la membrane a été effectué.

Dans un système "Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfert Cell" (Bio-Rad laboratories) le gel SDS-PAGE a été étalé sur un papier filtre, lui-même étalé sur un coussinet de fibre. La membrane de PVDF a été déposée sur le gel et par la suite, un second papier filtre ainsi qu'un second coussinet de fibre ont été déposés sur cette dernière. Le tout a été placé entre deux plaques de plastique, formant ainsi un support rigide qui a été déposé en position verticale, dans la cellule électrophorétique contenant le tampon, de façon à ce que le gel soit dirigé du côté de la cathode (-) et la membrane du côté de l'anode (+). Le transfert a été effectué à 4°C pendant 18 heures en appliquant un courant de 40V alimenté par un générateur de courant Bio-Rad de modèle 250/2.5 (Bio-Rad laboratories) et sous agitation à l'aide d'un barreau métallique alimenté par un générateur de courant Buchler. Par la suite, pour s'assurer que le transfert s'est bien effectué, la section de la membrane contenant le marqueur de Mr a été découpée puis colorée afin de visualiser les bandes.

Parallèlement au transfert, les bactéries *E coli* BL21(DE3) ont été pré-adsorbées avec le sérum anti-SwQc91 polyclonal ainsi qu'avec les différents AcMo. Cette étape a été effectuée afin de réduire le bruit de fond, puisque les sérums recueillis proviennent d'animaux qui possèdent dans leur flore intestinale la bactérie *E coli*. La pré-adsortion a permis la formation de complexes immuns non-spécifiques avec la bactérie.

Pour chaque sérum, quatre tubes eppendorfs de 1,5 ml ont été remplis de milieu 2xYT contenant les bactéries, qui ont préalablement poussé pendant 18 heures à 37°C, sous agitation constante. Les tubes ont ensuite été centrifugés à 10 000 x g pendant 2 min et le culot bactérien a été resuspendu dans 0,3 ml de PBS. La suspension bactérienne a été soniquée durant 3 cy cles de 10 sec à 30 MHz et par la suite 0,1 ml du sérum polyclonal et 0,1 ml des différents AcMo a été ajouté à un premier tube de bactéries soniquées, chaque

AcMo ayant été placé dans des tubes différents. Les tubes contenant les sérums et les bactéries ont été incubés 60 min sur une plaque rotative. Une fois l'incubation terminée, les tubes ont été centrifugés 5 min à 10 000 x g et le surnageant a été ajouté à un autre tube contenant 0,3 ml de bactéries soniquées. Cette étape a été effectuée à trois reprises et elle a été suivie d'une dernière incubation effectuée à 4°C pendant 18 heures. Les tubes contenant les bactéries pré-adsorbées avec les sérums ont été centrifugés et les surnageants ont été aliquotés et conservés à -80°C.

#### 3.14.2 Immunobuvardage

Suite au transfert, la membrane a été saturée pendant 2 heures dans une solution de blocage (2% (p/v) BSA et 0,1% (v/v) Tween-20) (Annexe 1, Section 13.0) à la température de la pièce et sous agitation. Le sérum anti-SwQc91 polyclonal pré-adsorbé avec les bactéries BL21(DE3) a été dilué 1 : 500 dans une solution de dilution (1% (p/v) BSA et 0,05% (v/v) Tween-20) et ajouté à la membrane saturée. Le tout a été incubé une heure à la température de la pièce sous agitation constante. Une fois l'incubation terminée, la membrane a été lavée à trois reprises pendant 15 min à l'aide d'une solution composée de TBS 1X et de 0,05% (v/v) Tween-20. Par la suite, deux autres lavages de 10 min avec du TBS 1X ont été effectués afin d'éliminer le surplus de Tween-20. La membrane a ensuite été incubée, pendant 45 min avec un Ac secondaire (anti-IgG de porc conjugué à la peroxy dase) (ICN) qui a été dilué 1:1000 avec la solution de dilution. Les différentes étapes de lavage ont été répétées et par la suite, la membrane a été incubée avec la solution de révélation, (0,06% (p/v) 4-chloro-1-naphtol (4CN)) (Bio-Rad) contenant un substrat enzymatique (Annexe 1, Section 13.0), jusqu'à l'apparition de bandes pourpres (environ 15 min). La réaction a ensuite été stoppée en déposant la membrane dans de l'eau distillée. Ces étapes ont été répétées pour chacun des AcMo dirigés contre la protéine M1 de la souche A/WSN/33 virus influenza.

#### 3.15 Immunisation des souris

L'immunisation a été réalisée selon la technique décrite dans Antibodies (1988). Au total, 30 souris Balb/c (Charles River, St-Constant, Québec, Canada) de sexe féminin, âgées

entre 6 et 8 semaines ont été utilisées et réparties en cinq groupes de 6 souris. Les différents groupes ont été identifiés dans l'ordre suivant selon l'échantillon qui leur a été administré: le groupe #1 immunisé avec du PBS 1X, le groupe #2 immunisé avec la protéine M1 native (PMN) électroéluée à partir du virus SwQc91 purifié, le groupe #3 immunisé avec la PMR électroéluée, le groupe #4 immunisé avec le virus SwQc91 purifié et le groupe #5 représenté par des souris non-immunisées et cohabitant dans la même pièce que les autres.

La dose a été calculée afin d'administrer 50 µg de la protéine M1 aux groupes #2, #3 et #4. Les souris des groupes #1 à #4 ont reçu 0,5 ml d'une émulsion (50 : 50) de l'échantillon jumelé à un adjuvant de Freund par voie intra-péritonéale, à 14 jours d'intervalle, à l'aide d'une seringue de 3 ml et d'une aiguille de 26G. L'adjuvant complet de Freund (Difco) a été utilisé lors de la première injection alors que pour les deux injections suivantes, c'est l'adjuvant incomplet de Freund (Difco) qui a été utilisé. Des échantillons sanguins ont été prélèvés sur les 30 souris, par ponction du sinus veineux situé au niveau de l'orbite oculaire au jour 0, ce prélèvement constituant le sérum pré-immun. Des prélèvements ont également été effectués aux jours 24, 38 et 54, soit 12 jours après chacune des injections et une dernière saignée a été effectuée trois semaines après le dernier prélèvement. Ces différents sérums ont permis d'étudier la cinétique des Ac générés suite à l'immunisation.

#### 3.16 Test ELISA indirect

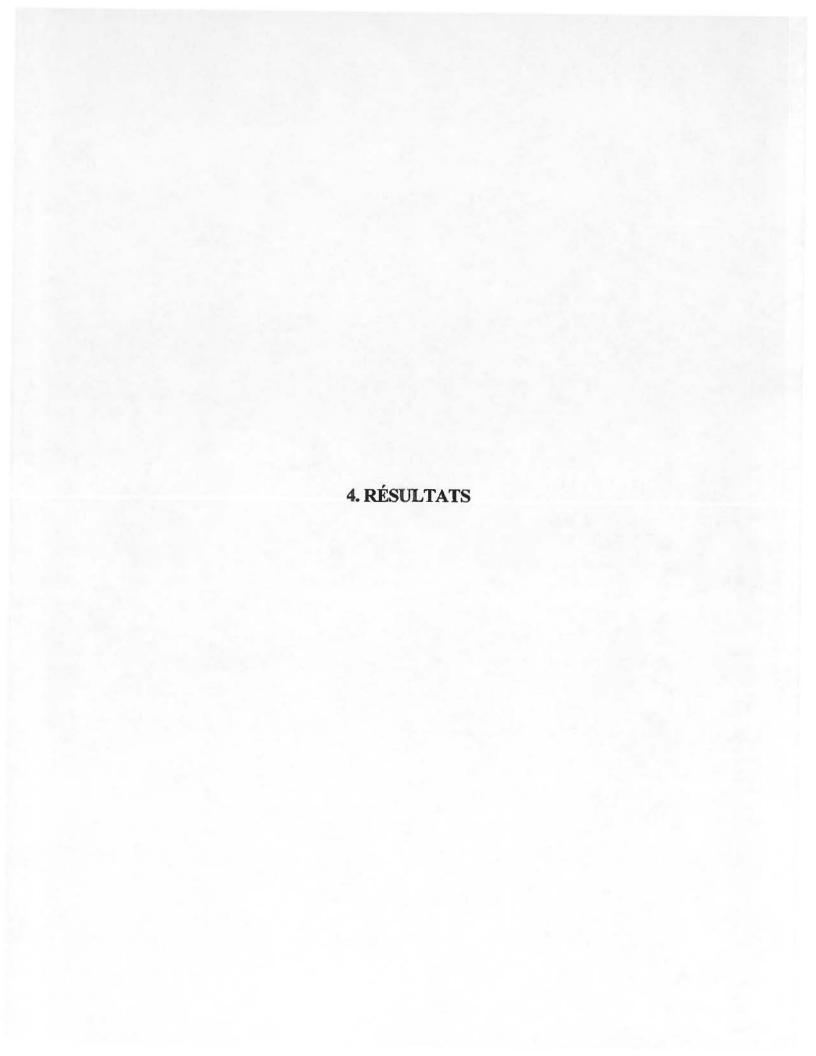
L'épreuve d'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indirect a été réalisée afin de détecter dans le sérum des souris immunisées, les Ac dirigés contre la protéine M1. La méthode employée a été celle décrite dans Antibodies (1988). Tout d'abord, la concentration du virus SwQc91 purifié a été ajustée à 10 µg/ml dans du tampon d'adsorption (0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub> (Baker), pH 9,6) (Annexe 1, Section 14.0) et un volume de 50 µl a été déposé dans les puits d'une plaque de 96 puits à fonds plats (Linbro/Titertek, ICN). La plaque a par la suite été incubée pendant 18 heures à la température de la pièce, ce qui a permis l'adsorption du virus au fond des puits.

Les sites libres ont été bloqués en ajoutant un volume de 0,3 ml d'une solution

composée de 2% (p/v) BSA et 0,1% (v/v) Tween-20 dans 10 mM de PBS à pH 7,4. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 2 heures à la température de la pièce. Suite à un lavage avec 0,3 ml d'une solution de 0,05% Tween-20 dans 10 mM de PBS pH 7,4, un volume de 50  $\mu$ l de la solution de dilution a été ajouté dans tous les puits, sauf dans ceux de la première rangée où un volume de 100  $\mu$ l de chaque sérum, dilué 1 : 1000 dans une solution de dilution de 1% BSA et 0,05% Tween-20 (Annexe 1, Section 14.0), a été ajouté. Des dilutions sérielles ont été effectuées et les sérums ont été incubés pendant 60 min à la température de la pièce. Les puits ont de nouveau été lavés à cinq reprises avec 0,3 ml de la solution de lavage, afin d'éliminer le surplus d'Ac qui ne ce seraient pas lier à l'Ag

Un volume de 50  $\mu$ l d'un Ac secondaire de chèvre (anti-IgG de souris (H+L) couplé à la peroxy dase) (Bio-Rad) qui a été dilué 1 : 4000 avec le tampon de dilution a été ajouté à tous les puits et le tout a été incubé pendant 60 min à la température de la pièce. Une dernière série de sept lavages a été effectuée avec 0,3 ml de tampon de lavage et un volume de 100  $\mu$ l d'une solution de révélation composée de 0,4% d'hypochlorure d'orthophény lène diamine (OPD, Sigma Chemical, Co., St-Louis, Missouri, USA) et 0,012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a par la suite été ajouté dans tous les puits. Les plateaux ont ensuite été incubés à la noirceur pendant 15 min à la température de la pièce et la réaction colorimétrique a été stoppée par l'ajout dans tous les puits d'un volume de 100  $\mu$ l d'une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N (Annexe 1, Section 14.0). Le test ÉLISA indirect a été effectué en utilisant 1  $\mu$ g/ml de la PMR comme Ag adsorbé dans le fond des puits.

Le témoin négatif, représenté par le sérum pré-immun, a été dilué de la même façon que les autres sérums tout comme le témoin positif représenté par le sérum hyperimmun de souris Balb/c anti-SwQc91. L'absorbance de chaque puit a été prise à une densité optique de 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ELISA (Benchmark Microplate reader, Bio-Rad, CA, USA). Le titre en Ac pour chaque groupe de souris immunisées a par la suite été évalué. Un résultat a été considéré comme positif lorsque la valeur de l'absorbance obtenue pour le sérum à tester était 3 fois celle de l'absorbance obtenue pour le sérum pré-immun. Les sérums ont été aliquotés dans des tubes eppendorfs de 1,5 ml et entreposés à -20°C.



#### 4.1 Purification et concentration

Pour la souche virale SwQc91 un volume d'environ 2,5 litres de liquide allantoïque, ayant au départ une activité hémagglutinante de 512 UHA/ml, a été concentré et purifié. Suite au dosage, la concentration protéique de la suspension virale SwQc91 était de 9,6 mg/ml, pour un volume final de 2 ml. L'activité hémagglutinante a été évaluée à 5,12 X 10<sup>5</sup> UHA/ml, ce qui a permis de calculer une activité spécifique de 5,33 X 10<sup>4</sup> UHA/mg. En ce qui concerne la souche SwQc81, elle a été concentrée et purifiée au cours d'un autre projet de maîtrise (Henrichon, 1997). L'activité hémagglutinante ainsi que l'activité spécifique ont été évaluées respectivement à 4,1 X 10<sup>5</sup> UHA/ml et 5,86 X 10<sup>4</sup> UHA/mg.

### 4.2 Profil polypeptidique des souches virales purifiées par SDS-PAGE

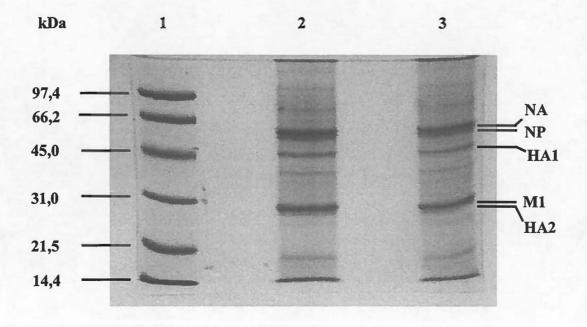
L'analyse du profil polypeptidique sur gel de polyacry lamide 12% en présence de SDS a permis d'évaluer la pureté des suspensions virales (Figure 3). En conditions réductrices, il a été possible de constater que les différentes protéines des souches virales SwQc81 (puit #2) et SwQc91 (puit #3) semblent être de même Mr. Les Mr des protéines NA, NP, HA1, M1 et HA2 ont été évaluées respectivement à 60 kDa, 56 kDa, 46 kDa, 28 kDa et 26 kDa. Les Mr similaires des protéines M1 et HA2 jumelées à la mauvaise résolution de l'image digitalisée font que seul la bande correspondant à la protéine M1 est visible sur le gel (Figure 3).

## 4.3 Extraction de l'acide ribonucléique viral (ARNv)

Suite à l'extraction, selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), la quantité d'ARNv a été dosée et sa pureté a été évaluée et ce pour chaque souche. Pour la souche SwQc81, l'ARNv a été extrait à partir de 1 mg de virus purifié et il a été possible d'obtenir une quantité de  $0.32\,\mu\text{g/}\mu\text{l}$  ayant un ratio 260/280 nm de 1.8 (Annexe 2). En ce qui concerne l'extraction de l'ARNv de la souche SwQc91, réalisée à partir de 3 ml de liquide allantoïque, il a été possible d'obtenir une quantité de  $0.64\,\mu\text{g/}\mu\text{l}$  dont le ratio 260/280 a été évalué à 1.8 (Annexe 2).

Figure 3: Analyse de la pureté des souches SwQc81 et SwQc91 par électrophorèse sur SDS-PAGE, en conditions réductrices.

Un volume des suspensions virales purifiées SwQc81 et SwQc91 a été dilué dans un volume égal d'une solution dénaturante 2X avec 5% de β-mercaptoéthanol. Une quantité de 20 μg de chaque suspension virale a été déposée dans les puits d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1,5 mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration du gel au bleu de coomassie (0,4%) a permis de visualiser le profil polypeptidique des 2 souches virales (voir technique décrite à la section 3.6 de l'approche expérimentale).



puit #1: Marqueur de masse moléculaire (2,0µg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa)

puit #2: Souche virale SwQc81 (20µg/20µl) en conditions réductrices

puit #3: Souche virale SwQc91 (20µg/20µl) en conditions réductrices

Les protéines virales observées par ordre décroissant sont : la NA monomérique, la NP, la sous-unité HA1 de l'HA, la protéine M1 et la sous-unité HA2 de l'HA.

4.4 Réaction de transcription inverse et d'amplication par polymérisation en chaîne (PCR) de l'ADNc

L'ARN génomique du segment #7, correspondant à la protéine M, a été transcrit en ADNc à partir de l'ARNv extrait pour chaque souche à l'aide d'amorces spécifiques et de la transcriptase inverse. Suite à la réaction de PCR il a été possible d'observer une bande, sur un gel d'agarose de 0,8%, d'environ 1 Kb ce qui semble correspondre au gène de la protéine M (1,027 Kb) (Figure 4).

#### 4.5 Clonage du gène de la protéine de la matrice

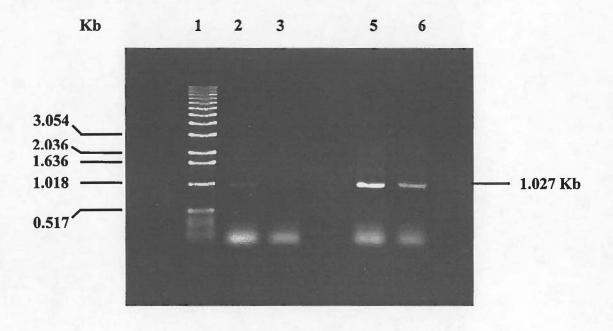
Les produits de PCR purifiés ont été introduits dans le vecteur pCR2.1. Suite à la transformation et au criblage des colonies obtenues, une digestion à l'aide de l'enzyme de restriction *Eco*RI a permis de visualiser la présence du gène de la protéine M pour les colonies C13, C45, C46 et C47 obtenues pour la souche SwQc81 et C5, C11, C17, C19 et C21 pour la souche SwQc91 (Figure 5). En effet, la présence de deux bandes a pu être observée, une de poids moléculaire estimé à environ 4 Kb correspondant au vecteur pCR2.1 linéarisé (3,900 Kb) et l'autre d'environ 1 Kb correspondant au poids moléculaire du gène de la protéine M (1,027 Kb) (Figure 5).

#### 4.6 Séquençage

Après avoir identifié les colonies possédant l'insert, trois colonies ont été choisies au hasard pour chaque souche (C13, C45 et C47 pour SwQc81 et C5, C11 et C17 pour SwQc91). L'ADN plasmidique de ces colonies a été produit et purifié en quantité suffisante pour pouvoir être séquencé. La technique qui a été employée est décrite à la section 5.0 de l'approche expérimentale. Les séquences ont été comparées avec une séquence porcine de référence A/Swine/Iowa/17672/88 (H1N1) (FLAM SI88) du gène de la protéine M afin de s'assurer qu'il s'agissait bien du bon gène. Les résultats obtenus ont permis d'observer que le gène de la protéine M contient bien 1027 nucléotides, et ce pour les trois colonies des deux souches porcines (Figure 6). De plus, il a été possible de noter que le cadre de lecture de la

Figure 4: Électrophorèse sur gel d'agarose de l'amplicon ADN du gène de la protéine de la matrice (M) produit par RT-PCR pour les souches porcines SwQc81 et SwQc91.

Un mélange contenant 2 µl du tampon échantillon 6X et 10 µl du produit d'amplification a été déposé dans les puits d'un gel d'agarose 0,8% (p/v) préparé dans du tampon TAE 1X. Le gel a été soumis à une tension constante de 90V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, le gel a été coloré dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/ml) pendant 40 min afin de permettre la visualisation sous les rayons UV du fragment d'ADNc du gène de la protéine M.



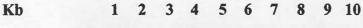
puit #1: 2 µl d'un marqueur d'ADN (1Kb DNA ladder)

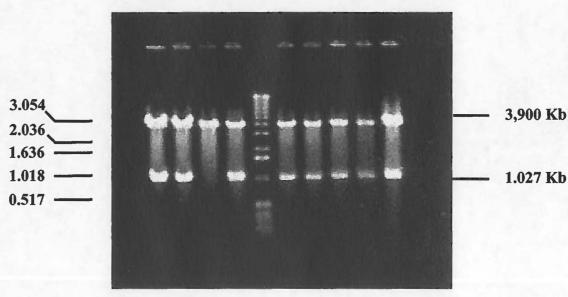
puits #2 et 5: Fragment d'ADNc, produit à l'aide de 2 μl et 4 μl d'ADNc suite à une réaction RT et amplifié par PCR, représentant le gène de la protéine M pour la souche SwQc81

puits #3 et 6: Fragment d'ADNc, produit à l'aide de 2 μl et 4 μl d'ADNc suite à une réaction RT et amplifié par PCR, représentant le gène de la protéine M pour la souche SwQc91

Figure 5: Profil électrophorétique des plasmides recombinants pCR 2.1/M extraits, pour la souche SwQc81 et SwQc91, des cellules compétentes INV $\alpha$ F suite à leur digestion avec l'enzyme de restriction EcoRI.

Pour chacune des colonies recombinantes analysées, un volume de 5  $\mu$ l de chaque produit digéré auquel a été ajouté 1  $\mu$ l de tampon échantillon 6X a été déposé dans les puits d'un gel d'agarose 0,8% (p/v) préparé dans du tampon TAE 1X. Les échantillons ont été soumis à une tension constante de 90V pendant 40 min. Suite à l'électrophorèse, une coloration du gel dans une solution de bromure d'éthidium (0,5  $\mu$ g/ml) a permis de visualiser, aux UV, les différents fragments d'ADN digérés. La taille de ces fragments a été estimée en comparant les bandes obtenues, suite à la migration, avec les bandes du marqueur de poids moléculaire (1Kb DNA ladder).





puit #5: 2 µl d'un marqueur d'ADN (1Kb DNA ladder)

puits #1 à #4: Colonies #13, #45, #46 et #47 obtenues suite à la digestion des plasmides recombinants pCR2.1/M pour la souche SwQc81

puits #6 à #10: Colonies #5, #11, #17, #19 et #21 obtenues suite à la digestion des plasmides recombinants pCR2.1/M pour la souche SwQc91

Figure 6: Étude comparative des séquences nucléotidiques des inserts d'ADNc de la protéine M, extraits de six colonies recombinantes et ce pour les souches virales SwQc81 et SwQc91, avec une séquence du gène de la protéine M provenant de la souche porcine A/Sw/Iowa/17672/88 (FLAMSI88).

Les séquences d'acides nucléiques des clones C13, C45 et C47 ainsi que des clones C5, C11 et C17, représentant le gène de la protéine M pour les souches virales SwQc81 et SwQc91, ont été comparées avec la séquence publiée de la souche FLAMSI88 (#accession Genebank: M63522) pour le même gène. Pour le séquençage des fragments d'ADN du gène de la protéine M les amorces oligonucléotidiques sens M/F(26-40):, anti-sens M/R(981-994) et une amorce interne M/R(721-742) ont été utilisées. Dans la figure, seule la séquence du gène de la protéine M de la souche porcine FLAMSI88 a été décrite sur toute sa longueur alors que pour les autres séquences seulement les différences ont été notées.

Les séquences débutent à l'extrémité 5' par une adénine

(A): Adénine

(T): Thymidine

(C): Cytosine

(G): Guanidine

(-): même nucléotide

(—): nucléotides formant la séquence codante de la protéine M1

(\*\*\*\*): nucléotides formant la séquence codante de la protéine M2

	10	20	30	40 ******	50 ******	** 60	70	80	90	100	110
FLAMSI88	AGCAAAAGCA	CCTACATOTT	TAAAGATGAG	TCTTCTAACC	GAGGTCGAAA	CGIAIGITCT	CICIAICGIT	CCGTCAGGCC	CCCTCAAAGC	CCACATAGCG	CAGAGACTIG
SwQc81C13				CC			C				
SwQc81C45				CC			C				
SwQc81C47				CC			C				
SwQc91C5							T				
Sw0c91C11							T				
SwQc91C17				,							
	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
FLAMSI88	ארבאונצויוייייייייייייייייייייייייייייייייי	TGCAGGGAAA	AACACTEATIC	יוייאריבנאניוויוי	CMUSCAMUSC	CTANACACNA	CACCAAIITTII	anceconding	PCALVO VALUE V	ייייייייייייייייייייייייייייייייייייייי	מאמוונונונונו
SwQc81C13	711111111	IOGIDOGIA		-A	CHOGANIOS	CDWAR	GALVAIGE	GICALICIG	ALIANSSSA	IIIIASAII	A
-				-A							7
SwQc81C45				-A							A
SwQc81C47				-A							A
SwQc91C5		1 101 11		-M							A
SwQc91C11				-A							A
SwQc91C17				-A							A
	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
FLAMSI88	CICACCGIGC	CCAGTGAGCG	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TIGICCAGAA	TGCCCTCAAT	GOGAATGGTG	ACCOCCAACAA	CATGGACAAA	GCGGTCAAAC	TGTACAGAAA
SwQc81C13											
SwQc81C45											
SwQc81C47											
SwQc91C5										A	
SwQc91C11										A	
SwQc91C17										A	
	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440
FLAMSI88	ACTTAAAAGG	GAAATAACAT	TOCACGGGGC	CAAAGAAGIA	GCCCTCAGTT	ACTOTOCTOC	TOCACTIOCC	AGTTGCATGG	GCCTCATATA	CAACAGAATG	GGGACTGTGA
SwQc81C13											C-
SwQc81C45			- '								C-
SwQc81C47								'			C-
SwQc91C5			-T	T				T	T		C-
SwQc91C11			-T	T				T	T		C-
SwQc91C17			-T	T				T	T		C-
	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
						CAUTTOCOACC	ATTICATION	ТАСАСАААТС	CACACAACAA	CONTRACTO	A AUTO-ACCOUNT
FLAMSI88	CCACTGAGGT	GGCCTTTGGT	CTAGTATGCG	CAACCTGTGA	ACAGATTGCT	GATICULASC	MICGATCICA		CHIMLIAN	annunci	WICKROCHI
	CCACTGAGGT	GGCCTTTGGT A	CTAGTATGCG	CAACCTGTGA	ACAGAITGCT	GATICULAGE	AICGAICICA		-T		
SwQc81C13	CCACTGAGGT	GGCCTTTGGT A	CTAGTATGCG	CAACCIGIGA	ACAGATTGCTA		AICGAICICA		-T		
SwQc81C13 SwQc81C45	CCACTGAGGT	A	CTAGTATGCG	CAACCIGICA	ACAGATTGCTAA				-T		
Swgc81C13 Swgc81C45 Swgc81C47	CCACTGAGGT	A	CTAGTATGCG	CAACCTGTGA	A		AICAICICA		-T		
SwQc81C13 SwQc81C45	CCACTGAGGT	A	CTAGTATGCG	CAACCTGTGA	A A		AICGAICTCA		-T -T		T

	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660
FLAMSI88	GAGAACAGAA	TOGENTEAC	CAGCACAACA	GCTAAAGCC	TGGAACAAAI	GOCTGGATCA	AGTGAACAAG	CAGCAGAGGC	TATOGAGGIT	GCCAGCCAGG	CTAGACAAAT
Sw0c81C13											G
SwQc81C45											G
SwQc81C47										A-	G
Sw0c91C5			G						AA	A-	G
9w0c91C11			G						AA	A-	G
SwQc91C17			G						AA	A-	G
ongos IcI.	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760 ******	770
					1.0000000000000000000000000000000000000						
FLAMSI88	GGTTCAGGCA .			CCPAGPICC					CCIAICALAA	ALGARIGIG	GIGCAAAIGC
9wQc81C13	A	G									G
SwQc81C45	A		••								G
SwQc81C47	A	G	A								G
SwQc91C5	A			•							G
SwQc91C11	A			•							G
SwQc91C17	A			T						А	G
	780 *******	790 ******	800 *******	810 ******				STOP 850	860 ******	870 ******	
FLAMSI88	AACGATTCAA	GIGATOCTCT	CETTOCTOTC	GCAAGCATCA	TIGGGATTIT	GCACCTGATA	TTGTGGATTC	TIGATOGICT	TTTTTCAAA	TOCATTTACC	GTCGCTTTAA
Sw0c81C13			с-		C-						
Sw0c81C45			C-		C-						
SwQc81C47			С-		C-						
SwQc91C5	G		С-								T
SwQc91C11	G		C-								T
SwQc91C17	G		С-								T
	890	900						960		980	990
FLAMSI88	ATACGGTCTG	AAAAGAGGGC	CTTCTACGGA	AGGAGTGCCG	GAGTOCATGA	GGGAAGAATA	TOGACAGAAA	CAGCAGAGTG	CTGTGGATGT	TGACGATGGT	CATTITICICA
SwQc81C13	Т				Т		G				
SwQc81C45	Т				Т		G				
SwQc81C47					Т		G				
SwQc91C5					Т		G				
Sw0c91C11					Т		G				
SwQc91C17					T		G				
	1000	STOP 1010	1020	1027							
FLAMSI88	********** ACATAGAGCT		y CHIN COLLINS	писти							
SwQc81C13	HLAIMSH3CT	WANNICHEN	ACIACTIGI	TICIACI							
Sw0c81C45											
SwQc81C47											
SwQc91C5											
9wQc91C11											
SwQc91C17											

protéine M1 débute au nucléotide #26 pour se terminer au nucléotide #784, correspondant au codon de terminaison de la traduction (STOP) (Figure 6). Le cadre de lecture de la protéine M2 débute au nucléotide #26 et se poursuit jusqu'au nucléotide #51, par la suite, il y a épissage jusqu'au nucléotide #740 et la traduction se poursuit sans interruption jusqu'au nucléotide #1007 correspondant au codon STOP (Figure 6).

Les séquences en aa de la protéine M1 et de la protéine M2 de la souche SwQc91 ont par la suite été déduites et comparées avec celles des protéines M1 et M2 de la souche SwQc81 (Figures 7 et 8). Cette comparaison a permis d'observer que les deux souches possèdent une protéine M1 constituée de 252 aa (Figure 7) alors que la protéine M2 est quant à elle constituée de 97 aa (Figure 8). Il a également été possible de constater, toujours au niveau des séquences en aa, deux changements pour la protéine M1 de la souche SwQc91 situés aux positions #4 et #205 sur la séquence, pour une homologie de 99,2% (Figure 7; Tableau I) entre les deux souches. En ce qui concerne la protéine M2 de la souche SwOc91, il a été possible de noter 5 changements en aa aux positions #4, #16, #21, #54 et #95 comparativement à la souche SwQc81, pour une homologie de 94,8% (Figure 8; Tableau I). Le taux de mutation (Annexe 2), correspondant au nombre de changements en aa observé par résidu par année, a été calculé pour chaque protéine de la souche SwQc91. Lorsque les séquences en aa des protéines M1 et M2 de la souche SwQc91 ont été comparées avec celles de la souche SwQc81, le taux de mutation a été évalué à 0.8 X 10<sup>-3</sup>, ce qui correspond à un pourcentage de variation de 0,08% pour la protéine M1 et à 5,15 X 10<sup>-3</sup> (pour un pourcentage de variation de 0,51%) pour la protéine M2 (Tableau I). Les séquences en aa des protéines M1 et M2 des souches SwQc81 et SwQc91 ont également été comparées avec d'autres séquences en aa des protéines M1 et M2 provenant de souches d'influenza porcin (H1N1), isolées entre 1930 et 1990. Il a été possible de noter 2 changements en aa pour la protéine M1 de la souche SwQc81 et de la souche SwQc91 alors que pour la protéine M2, 3 et 6 changements ont été notés respectivement pour la souche SwQc81et SwQc91 (Tableau II). Les pourcentages de variation des protéines M1 et M2 ont été évalués à 0,01% et 0,05% pour la souche SwOc81 et à 0.01% et 0.10% pour la souche SwQc91 (Tableau II).

Figure 7: Analyse comparative des séquences en aa de la protéine M1 des souches virales SwQc81 et SwQc91.

Les séquences en aa représentant la protéine M1 de chaque souche virale, provenant des clones C13, C45 et C47 (SwQc81) et des clones C5, C11 et C17 (SwQc91), ont été comparées avec la séquence publiée de la souche FLAMSI88 (#accession Genebank: M63522) pour la même protéine. Dans la figure, seule la séquence du gène de la protéine M de la souche porcine FLAMSI88 a été décrite sur toute sa longueur alors que pour les autres séquences seulement les différences ont été notées.

Les aa correspondant aux sites antigéniques définis pour le virus A/WSN/33 ont été identifiés.

Épitope 1: situé entre les aa 46-89 Épitope 2: situé entre les aa 129-164 Épitopes 3 et 4: situés entre les aa 45-119

Voir la liste des abréviations des aa à l'Annexe 3

	10	20	30	40	50	60	70	80
FLAMSI88	MSLLTEVETY V	VLSTVPSGPL	KAETAORLED	VFAGKNTDLE	ALMEWLKTRP	ILSPLTKGIL	GFVFTLTVPS	ERGLORRRFV
SwQc81C13	P							
SwQc81C45	P							
SwQc81C47	P							
SwQc91C5								
SwQc91C11								
SwQc91C17								
	90	100	110	120	130	140	150	160
FLAMSI88	QNALNGNGDP	NINIMOKAVIKT.Y	RKLKRETTEH	GAKEVALSYS	AGALASCMCT.	TANBACALALA	EVAFGI VCAT	CECTADSOHR
SwQc81C13	21111111111							
SwQc81C45								
SwQc81C47								
SwQc91C5								
SwQc91C11								
SwQc91C17								
	170	180	190	200	210	220	230	240
FLAMSI88	SHROMETTTN	PLIRHENRMV	LASTTAKAME	QMAGSSEQAA	EAMEVASQAR	QMVQAMRTIG	THPSSSAGLK	DDLLENLQAY
SwQc81C13								
SwQc81C45								
SwQc81C47								
SwQc91C5					_			
SwQc91C11								
SwQc91C17					I			
	250	252						
FLAMSI88	OKRMGVOMOR	FK						
SwOc81C13								
SwQc81C45								
SwQc81C47								
SwQc91C5								
SwQc91C11								
SwQc91C17								

Figure 8: Les séquences en aa, représentant la protéine M2 de chaque souche virale provenant des clones C13, C45 et C47 (SwQc81) et des clones C5, C11 et C17 (SwQc91), ont été comparées avec la séquence publiée de la souche FLAMSI88 (#accession Genebank: M63522) pour la même protéine. Dans la figure, seule la séquence du gène de la protéine M de la souche porcine FLAMSI88 a été décrite sur toute sa longueur alors que pour les autres séquences seulement les différences ont été notées.

Les aa correspondant aux sites antigéniques définis pour la protéine M2 ont été identifiés.

Voir la liste des abréviations des aa à l'Annexe 3

	10	20	30	40	50	60	70	80
FLAMSI88	MSLLTEVETP	IRNEWGCKCN	DSSDPLVAVA	SIIGILHLIL	WILPRLFFKC	IYRRFKYGLK	RGPSTEGVPE	SMREEYRQKQ
SwQc81C13	P		A-		N			
SwQc81C45	P		A-		N			
SwQc81C47	P		A-		N			
SwQc91C5		E	GA-		N	C		
SwQc91C11		E	GA-		N	C		
SwQc91C17		E	GA-		N	C		

	90	97
FLAMSI88	QSAVDVDDGH	FVNIELE
SwQc81C13		
SwQc81C45		
SwQc81C47		
SwQc91C5		G
SwQc91C11		G
SwQc91C17		G

Tableau I: Changements observés dans les séquences d'aa entre les protéines M1 et M2 des souches SwQc81 et SwQc91 et évaluation du taux de mutation, exprimé en pourcentage de variation, pour les protéines M1 et M2 de la souche SwQc91.

	Positions	SwQc81	SwQc91	Taux de mutation (% de variation)
	4	P	L	
M1	205	V	I	0,08
	4	P	L	
	16	G	E	
M2	21	D	G	0.51
	54	R	C	0,51
	95	E	G	

Tableau II: Évaluation du taux de mutation, exprimé en pourcentage de variation, pour les protéines M1 et M2 des souches SwQc81 et SwQc91, en comparant les changements en aa observés par résidu par année avec les séquences en aa des protéines M1 et M2 de d'autres souches d'influenza porcin (H1N1) (# accession du Genebank: M63517-M63520, M63522, M63525, M63532, M63534, M63535, M33045), isolées entre 1930 et 1990.

	Positions (aa)	Autres souches	SwQc81	Taux de mutation (% de variation)	Positions (aa)	Autres souches	SwQc91	Taux de mutation (% de variation)
M1	4	L	P	0,01	83	A	P	0,01
	214	V	Т		205	v	I	
	4	L	P		16	G	E	
	44	D	N	0,05	21	D	G	
M2	55	L	F		44	D	N	0,10
				3	54	R	С	15 1195
					55	L	F	4 1 3 g
					95	Е	G	

#### Légende:

M63517: A/Sw/29/37 (H1N1) FLAMSW37

M63518: A/Sw/March/52 (H1N1) FLAMSM52

M63519: A/Sw/Wisconsin/1/61 (H1N1) FLAMSW61

M63520: A/Sw/Ontario/2/81 (H1N1) FLAMSO

M63522: A/Sw/Iowa/17672/88 (H1N1) FLAMSI88

M63525: A/Sw/Netherlands/12/85 (H1N1) FLAMSN

M63532: A/Sw/Tennessee/24/77 (H1N1) FLAMSTN

M63534: A/Sw/Iowa/15/30 (H1N1) FLASI30

M63535: A/Sw/May/54 (H1N1) FLAMSM54

M33045: A/Sw/Iowa/15/30 (H1N1) FLASWIWM

#### 4.7 Expression de la protéine M1 de la souche SwQc91

L'insert représentant le gène de la protéine M, pour la souche SwQc91, a été souscloné dans le vecteur d'expression pET21(a) afin de produire la protéine M1 recombinante (PMR). Afin de déterminer les colonies exprimant la PMR, le criblage de 16 colonies choisies au hasard a été effectué suite à la transformation dans les cellules compétentes BL21(DE3). Dans ce but, les colonies choisies ont été induites pendant 4 heures à une température de 37°C avec une quantité finale d'IPTG de 1 mM. Ceci a permis d'obtenir les colonies C5, C24 et C28 (puit #8 du gel A et puits #4 et 8 du gel B) exprimant une protéine ay ant une Mr d'environ 28 kDa correspondant à celui de la protéine M1 (Figure 9).

#### 4.8 Solubilisation de la protéine M1 recombinante

Suite à l'expression de la protéine, une sonication de la suspension bactérienne des colonies C5, C24 et C28 a permis de constater, sur un gel de polyacry lamide de 12% en présence de SDS, que la protéine était présente à la fois dans les puits contenant le surnageant, sauf pour la colonie C5 (puit #3), et dans les puits contenant culot de cellules (Figure 10). Afin de libérer une plus grande quantité de PMR des corps d'inclusion de la bactérie BL-21(DE3) un traitement impliquant l'utilisation du SDS contenu dans du tampon Tris-HCl pH 7,5 suivi d'une incubation de 30 min à 50°C a été appliqué. Suite à ce traitement il a été possible d'observer la présence d'une bande de 28 kDa dans le puit #2 représentant la fraction solubilisée contenue dans le surnageant, cependant il est également possible de remarquer qu'il reste une quantité de PMR emprisonnée dans les corps d'inclusion de la bactérie BL-21(DE3) (puit #3) (Figure 11). Le pourcentage de PMR libérée des corps d'inclusion a été estimé à environ 30% (Figure 11).

## 4.9 Conditions optimales d'expression de la protéine M1 recombinante

Afin de déterminer les conditions optimales de production de la PMR, une cinétique d'expression a été effectuée en fonction de la température à laquelle l'induction a été réalisée, de la quantité d'IPTG utilisée ainsi que du temps d'induction. La suspension bactérienne

Figure 9: Profil électrophorétique, suite à une induction, des bactéries compétentes transformées avec les plasmides recombinants pET21/M.

Des cellules compétentes de *E.coli*, BL-21(DE3), transformées avec des plasmides recombinants pET21/M ont été ajoutées dans des tubes contenant 2 ml de milieu 2xYT supplémenté de 100 µg/ml de carbeniciline et les suspensions bactériennes ont été incubées pendant 18 heures à 37°C. L'expression a par la suite été induite par l'addition de 1 mM d'IPTG dans les suspensions bactériennes suivie d'une incubation de 4 heures à 37°C sous agitation. La suspension a par la suite été centrifugée et resuspendue dans 0,3 ml de PBS. Un volume de 15 µl de chaque culture a été prélevé et ajouté à un volume équivalent d'une solution dénaturante et réductrice (2X). Afin d'identifier les colonies recombinantes exprimant la PMR, une colonie transformée avec le plasmide parental (pET21a) a été utilisée comme témoin négatif. Cette colonie a été traitée selon les mêmes conditions que les autres. Le mélange a été déposé dans les puits d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1 mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration au bleu de coomassie (0,4%) a permis de visualiser le profil polypeptidique.

#### Gel A:

puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 µg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4kDa), la BSA (66,2kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5kDa) et le lysozyme (14,4kDa)

puit #2: suspension de bactéries compétentes non transformées

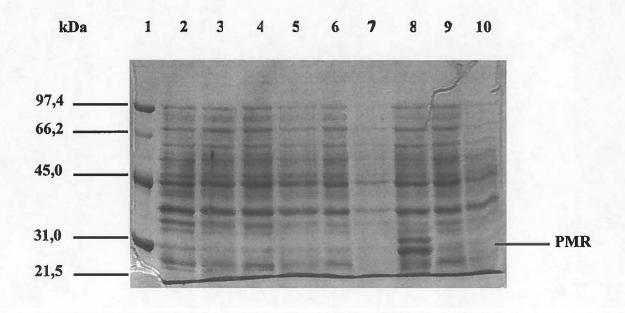
puit #3: suspension de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a)

puits #4 à #10: suspension de bactéries compétentes transformées avec les plasmides recombinants pET21/M (colonies 1 à 7)

### Gel B:

puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 µg par protéine)

puits #2 à #10: suspension de bactéries compétentes transformées avec les plasmides recombinants pET21/M (colonies 22 à 30)



Gel B

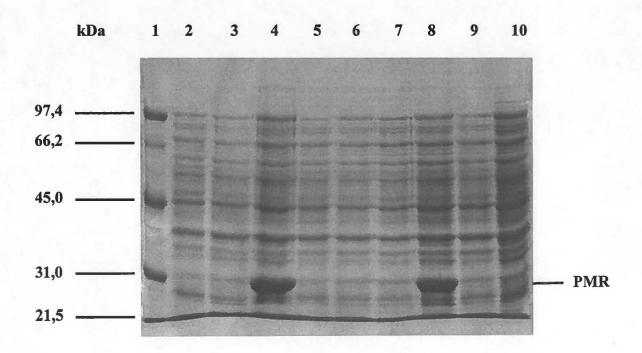
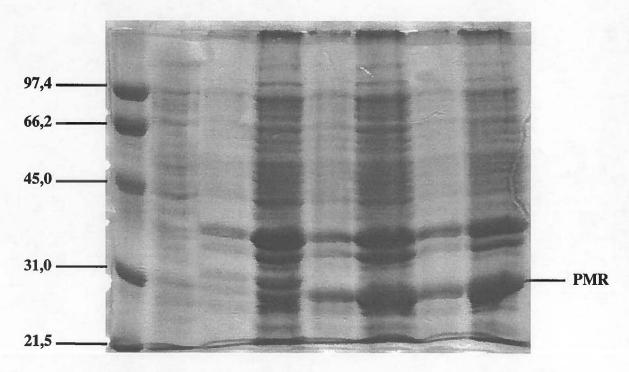


Figure 10: Profil électrophorétique représentant les fractions recueillies du culot et du surnageant, suite à une sonication des suspensions contenant les bactéries recombinantes exprimant la protéine M1 recombinante (PMR).

Des cellules compétentes de *E.coli*, BL-21(DE3), transformées avec des plasmides recombinants pET21/M, ont été ajoutées dans des tubes contenant 2 ml de milieu 2xYT supplémenté de 100 µg/ml de carbeniciline et incubées pendant 18 heures à 37°C. L'expression a par la suite été induite par l'addition de 1 mM d'IPTG dans les suspensions bactériennes, suivie d'une induction de 4 heures à 37°C sous agitation. La suspension a par la suite été centrifugée et resuspendue dans 0,3 ml de PBS. Suite à une sonication de trois fois 10 sec à 30MHz, la suspension a été centrifugée et le surnageant a été conservé dans un autre tube puis un volume de 15 µl a été prélevé et mélangé à un volume égal d'une solution dénaturante et réductrice (2X). Le culot a été resuspendu avec 100 µl de la même solution puis un volume de 15 µl a été prélevé. Le mélange a ensuite été déposé dans les puits d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1 mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration au bleu de coomassie (0,4%) a permis de visualiser le profil polypeptidique des lysats bactériens.





puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 μg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa) et l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa)

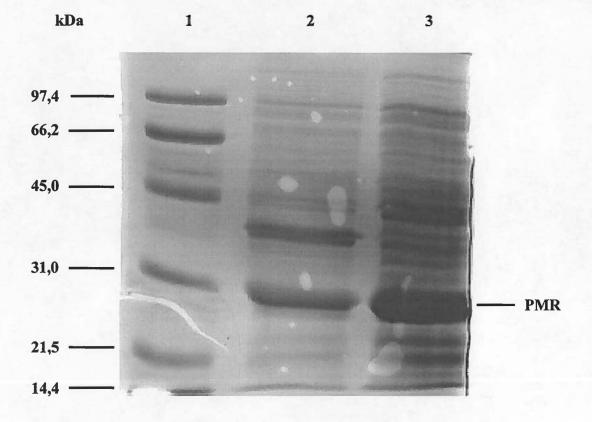
puit #2: lysat de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a), induites pendant 4 heures à 37°C avec une quantité de 1 mM d'IPTG

puits #4, #6 et #8 : PMR contenue dans le culot d'un lysat de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonies 5, 24 et 28) après sonication, suite à une induction pendant 4 heures à 37°C avec une quantité de 1 mM d'IPTG

puits #3, #5 et #7 : PMR contenue dans le surnageant d'un lysat de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonies 5, 24 et 28) après sonication, suite à une induction pendant 4 heures à 37°C avec une quantité de 1 mM d'IPTG

Figure 11: Traitement impliquant l'utilisation de SDS afin de libérer une plus grande quantité de PMR des corps d'inclusion de la bactérie *E. coli*, BL21(DE3).

Suite à l'induction de la PMR dans les cellules compétentes d'*E. coli*, BL21(DE3), les fractions recueillies à partir du culot et du surnageant (Figure 10) ont permis de constater que la protéine était enfermée en partie dans les corps d'inclusion de la bactérie. Afin de tenter de libérer une plus grande quantité de PMR des corps d'inclusion de la bactérie, un traitement impliquant l'utilisation de SDS dans du tampon 100 mM Tris-HCl pH7,5 suivi d'une incubation à 50°C pendant 30 min a été appliqué sur la fraction recueillie à partir du culot. Suite à une centrifugation, le surnageant a été déposé dans un autre tube et le culot a été resuspendu avec une solution dénaturante et réductrice (2X). Les mélanges ont été déposés dans les puits (d'un peigne de 5 puits) d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1,5 mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration au bleu de coomassie (0,4%) a permis de visualiser le profil polypeptidique des lysats bactériens.



puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 μg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa)

puit #2: fraction correspondant au surnageant contenant un lysat de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites pendant 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG, suite au traitement

puit #3: fraction correspondant au culot contenant un lysat de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites pendant 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG, suite au traitement

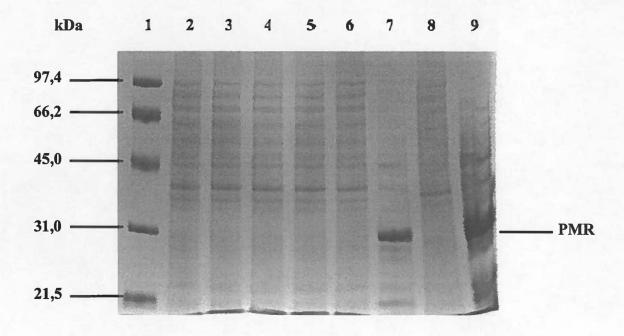
contenant le plasmide recombinant pET21/M (colonie C24) a été induite à 25°C, 30°C, 33°C ou 37°C avec 1 mM d'IPTG pendant 4 heures et les résultats obtenus ont permis de constater qu'une production élevée de PMR a pu être observée à 37°C (Figure 12, Gel A). Les expériences qui ont été effectuées afin de vérifier l'effet de différentes quantités d'IPTG utilisées (0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM et 1 mM d'IPTG à 37°C pendant 4 heures) lors de l'induction ont démontré que bien qu'il soit possible d'observer une production de PMR, en utilisant une quantité de 0,5 mM d'IPTG, la production semble optimale lorsque 1 mM d'IPTG est utilisé (Figure 12, Gel B). Suite à ces observations, la suspension bactérienne contenant le plasmide recombinant pET21/M (colonie C24) a de nouveau été induite à 37°C avec une quantité d'IPTG de 1 mM finale à différents temps d'induction, soit pendant 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20 et 24 heures. Les résultats ont démontré qu'à partir de 30 min il a été possible de noter la présence d'une bande ayant une Mr de 28 kDa. Cette bande correspondant à la PMR semble devenir une composante majeure de la suspension bactérienne après 4 heures d'induction et cette production semble atteindre un plateau après 12 heures d'induction (Figure 13, Gels A et B).

# 4.10 Électroélution de la protéine M1 recombinante

Un volume de 200 ml de suspension bactérienne contenant le plasmide recombinant pET21/M (colonie C24) a été induit à 37°C, pendant 12 heures et en utilisant 1 mM d'IPTG. Par la suite, la PMR produite a été concentrée et électroéluée, selon la technique décrite à la section 3.13.2. Suite à une dialy se, la pureté de la PMR a été évaluée sur un gel de polyacry lamide de 12% en présence de SDS. Comparativement à la PMR solubilisée, contenue dans le puit #3, il a été possible de constater que la présence d'une seule bande, contenue dans le puit #2, ay ant une Mr de 28 kDa PMR électroéluée (Figure 14). De plus, le résultat du dosage de la PMR électroéluée, concentrée et dialy sée a démontré qu'il a été possible de recouvrir 2,5 mg/ml par 200 ml de suspension bactérienne, suite pour une production totale de 5 mg.

Figure 12: Détermination des conditions optimales de production de la PMR dans les cellules compétentes d'*E.coli*, BL21(DE3), transformées avec le plasmide recombinant pET21/M en fonction de la température et de la quantité d'IPTG utilisée lors de l'induction.

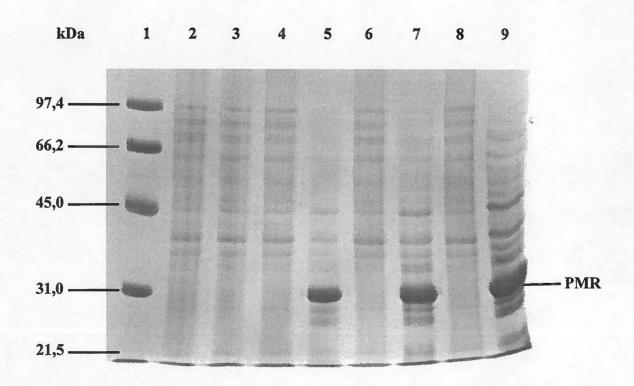
Des bactéries E.coli transformées avec une colonie (C24) exprimant la protéine M1 ont été inoculées dans des tubes contenant 2 ml de milieu 2xYT et 100 µg/ml de carbeniciline. Afin d'identifier les colonies recombinantes exprimant la PMR, une colonie transformée avec le plasmide parental (pET21a) a été utilisée comme témoin négatif. Cette colonie a été traitée selon les mêmes conditions que les autres. Suite à une incubation de 18 heures à 37°C, l'expression de la PMR a été induite avec l'ajout de 1 mM d'IPTG aux températures suivantes: 25°C, 30°C, 33°C et 37°C (Gel A) et sous agitation pendant 4 heures. De plus, la colonie exprimant la protéine tout comme celle transformée avec le plasmide parental pET21(a) ont été induites à 37°C pendant 4 heures avec les quantités d'IPTG suivantes: 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM et 1 mM, sous agitation (Gel B). Les échantillons ont par la suite été centrifugés et resuspendus dans 0,3 ml de PBS. Un volume de 15 µl de chaque culture a été prélevé et ajouté à un volume équivalent d'une solution dénaturante et réductrice (2X). Le mélange a été déposé dans les puits d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1 mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration au bleu de coomassie (0,4%) a permis de visualiser le profil polypeptidique.



puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 μg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa) et l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa)

puits #2, #4, #6 et #8: suspension de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a) et induites respectivement pendant 4 heures à 25°C, 30°C, 33°C et 37°C avec 1 mM d'IPTG

puits #3, #5, #7 et #9: suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites respectivement pendant 4 heures à 25°C, 30°C, 33°C ou 37°C avec 1 mM d'IPTG



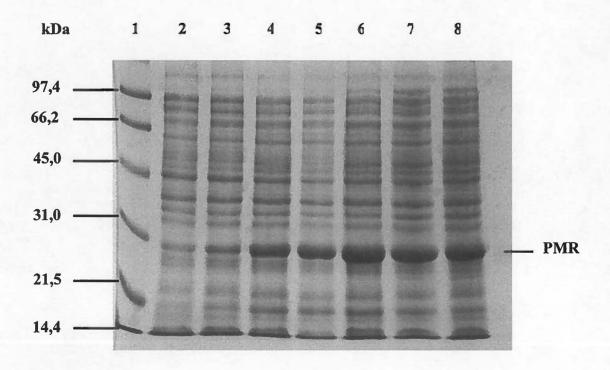
puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 µg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa) et l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa)

puits #2, #4, #6 et #8: suspension de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a) et induites respectivement pendant 4 heures à 37°C avec 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM et 1 mM d'IPTG

puits #3, #5, #7 et #9: suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites respectivement pendant 4 heures à 37°C avec 0,25 mM, 0,50 mM, 0,75 mM et 1 mM d'IPTG

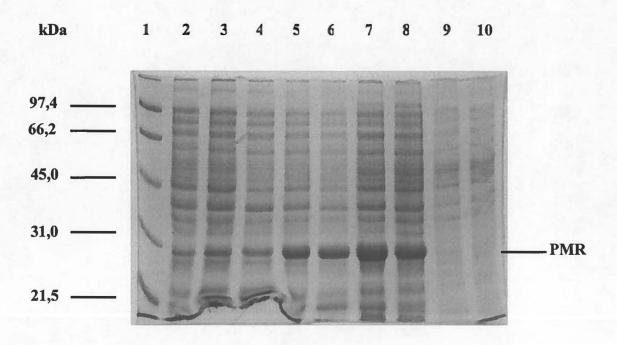
Figure 13: Cinétique d'expression de la PMR produite dans les cellules compétentes d'*E. coli*, BL 21(DE3), transformées avec le plasmide recombinant pET21/M, en fonction du temps d'induction, selon une quantité d'IPTG et une température optimales préalablement déterminées.

Des bactéries *E.coli* transformées avec une colonie (C24) exprimant la protéine M1 ont été inoculées dans des tubes contenant 2 ml de milieu 2xYT et 100 µg/ml de carbeniciline. La colonie transformée avec le plasmide parental (pET21a) a été induite à 37°C avec 1 mM d'IPTG pendant 4 heures sous agitation et utilisée comme témoin négatif. Cette colonie a été traitée selon les mêmes conditions que les autres. Les suspensions bactériennes ont été incubées pendant 18 heures à 37°C. L'expression de la PMR a par la suite été induite avec l'ajout de 1 mM d'IPTG, à 37°C aux différents temps d'expression suivants: 30 min, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 18, 20 et 24 heures, sous agitation. Les échantillons ont par la suite été centrifugés puis resuspendus dans 0,3 ml de PBS. Un volume de 15 µl contenant la même quantité de protéines, déterminée suite au dosage des échantillons à 280 nm, a été ajouté à un volume équivalent d'une solution dénaturante et réductrice (2X). Les mélanges ont été déposés dans les puits d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1 mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration au bleu de coomassie (0,4%) a permis de visualiser le profil polypeptidique.



puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 µg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa)

puits #2 à #8: suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites respectivement pendant 30 minutes, 1 heure, 4, 8, 12, 18 et 24 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG



puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 µg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa) et l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa)

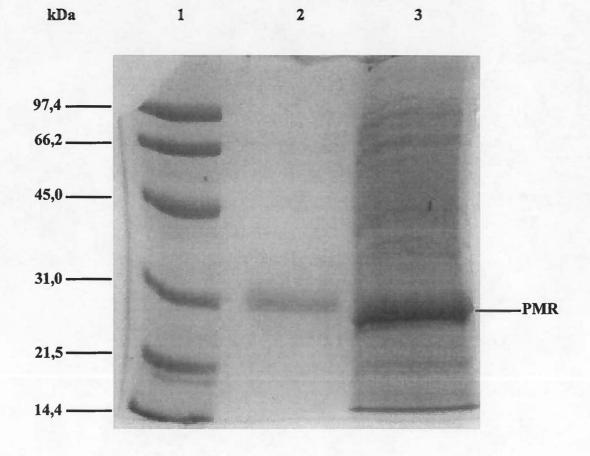
puits #2 à #8: suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites respectivement pendant 2, 3, 5, 6, 10, 14 et 20 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG

puit #9: suspension de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a) et induites respectivement pendant 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG

puit #10: suspension de bactéries compétentes non transformées

Figure 14: Électroélution de la PMR et vérification de la pureté à l'aide d'un gel SDS-PAGE, en conditions réductrices.

Des bactéries E. coli transformées avec une colonie (C24) exprimant la protéine M1 ont été inoculées dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 200 ml de milieu 2xYT et 100 µg/ml de carbeniciline. La colonie transformée avec le plasmide parental (pET21a) a été induite à 37°C avec 1 mM d'IPTG et pendant 12 heures sous agitation. Suite au traitement de solubilisation impliquant le SDS, un volume de 1 ml a été ajouté à un volume équivalent d'une solution dénaturante et réductrice (2X). Le mélange a été déposé dans le puit le plus large (d'un peigne, de 1,5 mm, composé d'un petit et d'un grand puit) d'un gel de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposé d'un gel de tassement de 4% (1,5mm d'épaisseur). Le gel a été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, les extrémités du gel contenant le marqueur et une partie de l'échantillon ont été découpées à l'aide d'un scalpel, puis colorées au bleu de coomassie (0,4%) pendant 20 min. Les extrémités ont été remises en place sur le gel et la bande correspondant à la PMR a été excisée du gel. Les bandes de la protéine ont été conservées dans du PBS à 4°C jusqu'à l'électroélution. Après avoir répété ces étapes 5 à 6 fois, la PMR contenue dans les bandes recueillies a été électroéluée, concentrée et dialysée, selon la technique décrite à la section 3.12.2 de l'approche expérimentale.



puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 µg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa)

puit #2: PMR électroéluée, concentrée et dialysée, suite à son induction pendant 12 heures à 37°C avec une quantité de 1 mM d'IPTG et à sa solubilisation des corps d'inclusion de la bactérie d'*E. coli*, BL21(DE3)

puit #3: PMR contenue dans le surnageant d'un lysat de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24), suite à son induction pendant 12 heures à 37°C avec une quantité de 1 mM d'IPTG et solubilisée des corps d'inclusion de la bactérie d'*E. coli*, BL21(DE3)

#### 4.11 Réaction de la protéine M1 recombinante contre un sérum polyclonal anti-SwOc91

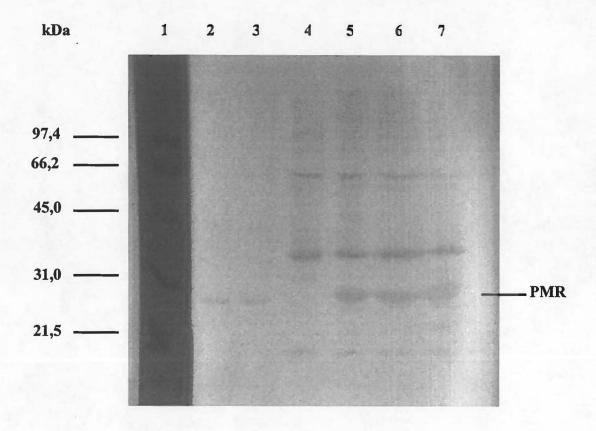
L'antigénicité de la PMR a été vérifiée à l'aide d'un immunobuvardage de type "Western" impliquant l'utilisation d'un sérum polyclonal anti-SwQc91, selon la technique décrite à la section 3.13.2 de l'approche expérimentale. Les résultats obtenus ont permis de constater l'apparition d'une bande ayant une Mr de 28 kDa correspondant à la protéine M1, dans les puits contenant la PMR solubilisée des corps d'inclusion, la PMR électroéluée ainsi que dans le puit contenant la protéine M1 native (PMN) provenant du virus SwQc91 purifié (Figure 15). Afin de s'assurer que les bandes obtenues étaient bien la PMR, un témoin négatif a été inclu dans le puit #4 contenant la suspension bactérienne (BL-21(DE3)) exprimée à 37°C pendant 4 heures avec 1 mM d'IPTG. Il a été possible de constater qu'aucune protéine bactérienne ayant une Mr de 28 kDa n'a pu être détectée (Figure 15).

### 4.12 Vérification de l'intégrité des quatre épitopes de la protéine M1 recombinante

L'intégrité des quatre épitopes de la PMR a également été vérifiée par immunobuvardage de type "Western" à l'aide de cinq AcMo, selon la technique décrite à la section 3.13.2 de l'approche expérimentale. Pour l'AcMo M2-1C6 dirigé contre l'épitope #1, situé entre les aa 46 et 89, il a été possible d'obtenir une bande d'environ 28 kDa dans les puits #4, #5 et #6 contenant respectivement la PMR solubilisée des corps d'inclusion, la PMR électroéluée ainsi que la PMN électroéluée. Il a également été possible de noter l'absence de réaction dans les puits #2 et #3 contenant deux témoins négatifs. Le premier étant la suspension bactérienne BL-21(DE3) et le second le vecteur pET21(a) contenu dans la suspension bactérienne BL-21(DE3) (Figure 16, Gel A). En ce qui concerne les AcMo M1-289/4 et M1-7E5 dirigés contre l'épitope #2, situé entre les aa 129 à 164, ainsi que les AcMo M1-904/6 et M1-5C9 dirigés respectivement contre les épitopes #3 et #4 (aa 45-119), les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour l'épitope #1 (Figure 16, Gels B, C, D et E).

Figure 15: Analyse de la réactivité antigénique de la PMR à l'aide d'un sérum polyclonal anti-SwQc91 par la méthode d'immunobuvardage.

Un volume de 20 µl, composé de 20 µg de PMR contenue dans une suspension bactérienne d'E.coli ((BL21(DE3)) préalablement induite avec 1 mM d'IPTG pendant 2, 4 et 8 heures à 37°C, a été ajouté à un volume équivalent d'une solution dénaturante et réductrice (2X). La protéine M1 native (PMN) (10 μg), électroéluée à partir du virus purifié SwQc91, et la PMR (10 µg) électroéluée contenues chacune dans un volume de 20 µl ont été ajoutées à un volume équivalent de la solution dénaturante et réductrice (2X). La colonie transformée avec le plasmide parental (pET21a) a été induite à 37°C avec 1 mM d'IPTG pendant 4 heures sous agitation et utilisée comme témoin négatif afin de s'assurer qu'il n'y avait pas une protéine bactérienne ayant la même masse moléculaire que la protéine M1. Les mélanges ont été déposés dans les puits de deux gels de séparation de polyacrylamide de 12% en présence de SDS superposés chacun d'un gel de tassement de 4% (1,5mm d'épaisseur). Les gels ont été soumis à une tension constante de 200V pendant 40 min à la température de la pièce. Suite à l'électrophorèse, la coloration au bleu de coomassie (0,4%) d'un des deux gels a permis de visualiser le profil polypeptidique. Le second a été incubé dans le tampon de transfert. Suite au transfert électrophorétique sur une membrane de PVDF, l'immunobuvardage a été effectué, selon la technique décrite à la section 3.13.2 de l'approche expérimentale, à l'aide d'un sérum polyclonal porcin anti-SwQc91 dilué 1 : 500. Un Ac secondaire de porc anti-IgG de lapin (High + Low chain) conjugué à une peroxydase et dilué 1 : 1000 a également été utilisé.



puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 μg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4 kDa), la BSA (66,2 kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0 kDa) et l'inhibiteur de trypsine (21,5 kDa)

puit #2: PMN électroéluée et concentrée

puit #3: PMR électroéluée et concentrée

puit #4: suspension de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a), induites pendant 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG

puits #5 à #7: suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M (colonie 24) et induites respectivement pendant 2, 4 et 8 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG

Figure 16: Étude sur l'intégrité des quatre épitopes de la PMR par l'analyse de leur réactivité avec cinq AcMo à l'aide de la méthode d'immunobuvardage.

La procédure appliquée lors de l'immunobuvardage avec le sérum polyclonal anti-SwQc91 a été répétée pour tester la réactivité des quatre épitopes. Les AcMo M2-1C6 (Gel A), M1-289/4 (Gel B) et M1-904/6 (Gel D) dirigés respectivement contre les épitopes #1, #2 et #3 ont été dilués chacun 1 : 500. Les AcMo M1-7E5 (Gel C) et M1-5C9 (Gel E) dirigés contre les épitopes #2 et #4 ont été dilués 1 : 5 000. Un Ac secondaire de souris anti-IgG de chèvre (High + Low chain) conjugué à la peroxydase a été dilué 1 : 3 000, lors des expériences impliquant les AcMo M2-1C6, M1-289/4 et M1-904/6, et dilué 1 : 1 000 lors des expériences impliquant les AcMo M1-7E5 et M1-5C9. Les mêmes échantillons ont été placés dans le même ordre pour les cinq gels:

puit #1: marqueur de masse moléculaire (2 μg par protéine) comprenant la phosphorylase B (97,4kDa), la BSA (66,2kDa), l'ovalbumine de l'oeuf (45,0kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31,0kDa), l'inhibiteur de trypsine (21,5kDa) et le lysozyme (14,4kDa)

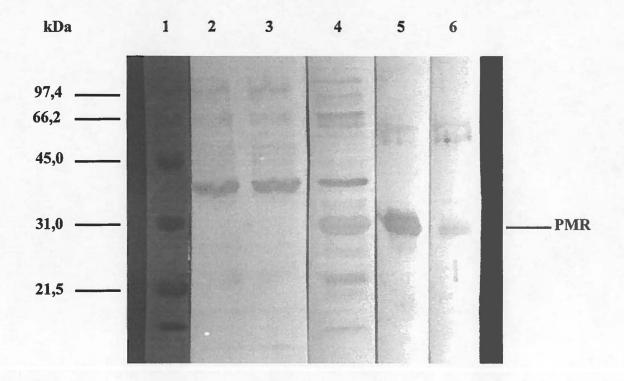
puit #2: suspension de bactéries compétentes non transformées

puit #3: suspension de bactéries compétentes transformées avec le vecteur parental pET21(a) et induites pendant 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG

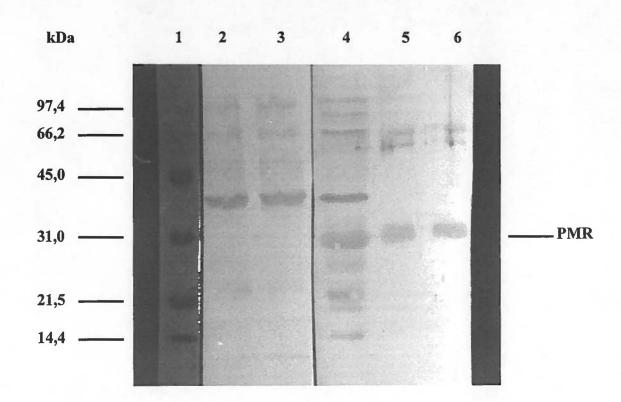
puit #4: suspension de bactéries compétentes transformées avec le plasmide recombinant pET21/M et induites pendant 4 heures à 37°C avec 1 mM d'IPTG

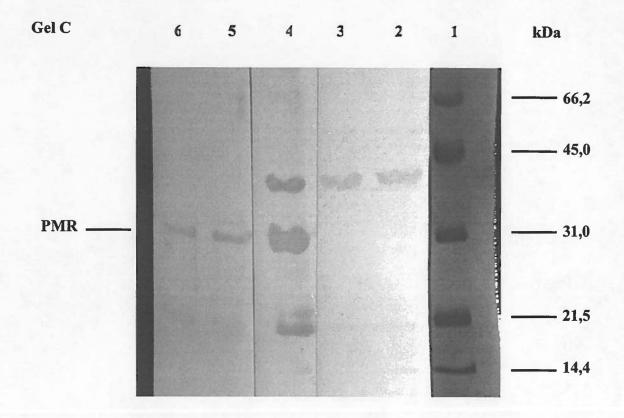
puit #5: PMR électroéluée et concentrée

puit #6: PMN électroéluée et concentrée

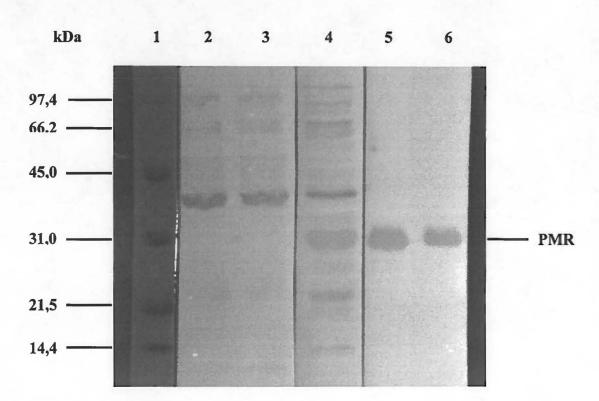


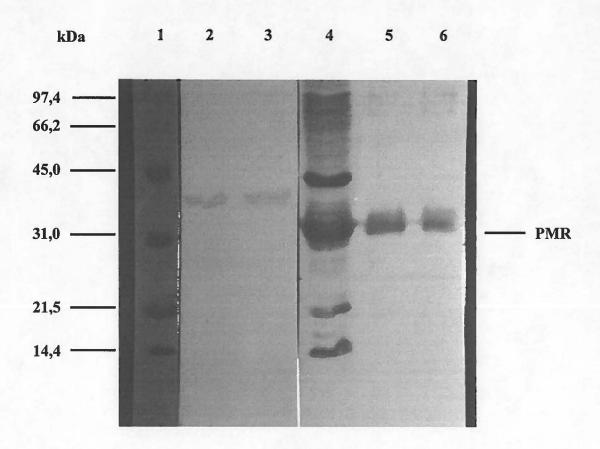
Gel B





Gel D





## 4.13 Évaluation de l'immunogénicité de la protéine M1 recombinante

Le titre en Ac a été calculé, suite à l'immunisation des souris Balb/c, après chaque rappel et ce à l'aide du test ÉLISA indirect. Suite au premier prélèvement, les premiers Ac détectés, lorsque l'Ag utilisé était le virus complet SwQc91 (10 µg/ml), dans le sérum provenaient des souris immunisées avec le virus SwQc91 et appartenant au groupe #4. En effet, un titre évalué à 32 000 a pu être noté. Ce titre a augmenté progressivement jusqu'à la troisième immunisation, où il est passé à 256 000 (Figure 17A). Cependant, ce n'est que suite au troisième prélèvement que des titres plus élevés en Ac anti-PMN et en Ac anti-PMR ont pu être calculés pour les groupes #2 et #3, soit respectivement 128 000 et 64 000. Les résultats ont permis d'observer qu'aucun titre significatif en Ac n'a pu être noté pour le groupe #1 représentant les souris immunisées avec le PBS (Figure 17A).

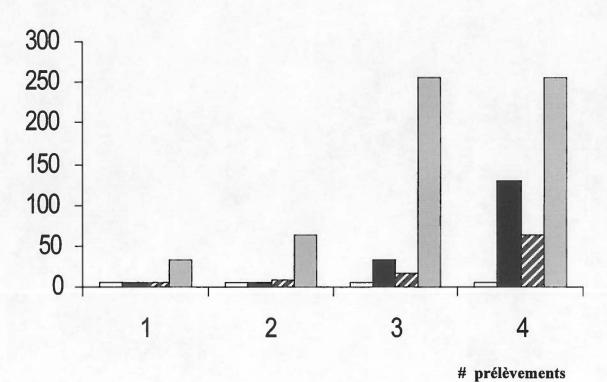
Le test ÉLISA indirect a également été réalisé en utilisant la PMR électroluée (1 µg/ml) comme Ag adsorbé dans le fond des puits. Suite au premier prélèvement, les Ac anti-PMR ont été les premiers détectés et le titre en Ac a été évalué à 8 000. Ce titre a augmenté rapidement pour atteindre 256 000, suite au troisième prélèvement et il est demeuré le même suite au quatrième prélèvement (Figure 17B). Les Ac anti-PMN ont pu être détectés suite au second prélèvement de sérum et leur titre a été évalué à 8 000 pour atteindre 256 000, après le troisième prélèvement (Figure 17B). Quant aux Ac anti-SwQc91, ils ont été détectés seulement suite à la deuxième immunisation, suite au second prélèvement, et le titre a alors été évalué à 32 000. Ce titre a atteint une valeur maximale de 128 000, et cette valeur est demeurée constante même après trois semaines suivant le dernier prélèvement (Figure 17B). Tout comme lors de la première série de test, aucun titre significatif en Ac n'a pu être détecté pour le groupe de souris #1 immunisé avec le PBS (Figure 17B).

Figure 17: Évaluation du titre des anticorps, détectés dans le sérum de souris Balb/c immunisées avec quatre groupes d'échantillon, à l'aide d'un test ÉLISA indirect.

Le test ÉLISA indirect a été effectué selon la technique décrite à la section 10.0 de l'approche expérimentale. La première série de test a été effectuée avec un volume de 50 µl, contenant 10 µg/ml de la souche virale SwQc91 (Figure 17A), qui a été déposé dans les puits d'un plateau de 96 puits qui a par la suite été incubé pendant 18 heures à la température de la pièce. Après avoir bloqué les sites libres, un volume de 50 µl de chaque sérum, dilué 1 : 500, représentant les différents groupes a été ajouté et dilué en série logarithmique de base 2 à partir de 1 : 500 à 1 : 1 024 000. Un Ac secondaire de souris anti-IgG de chèvre (High + Low chain) conjugué à la peroxydase a été dilué 1 : 4 000 et ajouté suite aux lavages. Une solution de révélation composée de 0,4% (p/v) d'OPD a été ajoutée et la plaque a été incubée à la noirceur afin de permettre la formation du chromagène soluble. La réaction a été stoppée avec du HCl 1N. Un sérum pré-immun, prélevé pour chaque souris avant les immunisations et dilué 1 : 500, a été utilisé comme témoin négatif. Les souris ont été immunisées de façon intra-péritonéale à 14 jours d'intervalle. Les sérums ont été recueillis 12 jours après chaque immunisation. En ce qui concerne la deuxième série de test, les étapes décrites précédemment ont été répétées mais en adsorbant un volume de 50 µl, contenant 1 µg/ml de la PMR, dans le fond des puits pendant 18 heures à la température de la pièce (Figure 17B).

Titre en Ac

 $X 10^3$ 



## Légende:

Groupe #1: PBS

Groupe #2: Protéine native

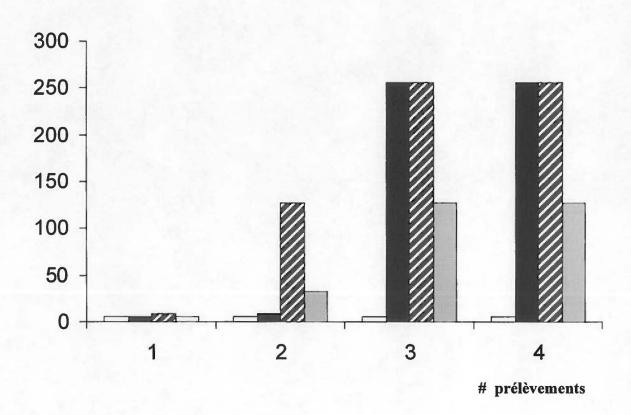
Groupe #3: Protéine recombinante

Groupe #4: Virus SwQc91

B)

Titre en Ac

 $X 10^3$ 



# Légende:

- Groupe #1: PBS
- Groupe #2: Protéine native
- Groupe #3: Protéine recombinante
- Groupe #4: Virus SwQc91



Cette étude portait sur le séquençage du gène de la protéine M ainsi que sur l'expression de la protéine M1 dans un vecteur d'expression procary otique. La réalisation de cette étude reposait en grande partie sur l'atteinte des trois objectifs suivants: 1) Comparer les séquences génomiques des protéines M1 et M2 pour les souches SwQc81 et SwQc91; 2) Produire la PMR dans un vecteur d'expression procary ote et ensuite la purifier; 3) Évaluer l'antigénicité et l'immunogénicité de la PMR.

Au préalable, l'analyse de la pureté des protéines virales ainsi que l'analyse génomique de l'ADNc de la protéine M de chaque souche a été effectuée. Ces prémisses se sont avérées essentielles puisque les propriétés biologiques des souches virales étudiées auraient pu être altérées, car elles sont cultivées dans des oeufs embryonnés. Ces dernières auraient également pu être altérées à cause des mutations engendrées au cours de la synthèse du brin d'ADNc lors du RT-PCR. Ces mutations lorsqu'elles sont amplifiées sur 35 cycles peuvent entraîner plusieurs changements au niveau du génome. Suite à la purification des souches virales concentrées SwQc81 et SwQc91 cultivées dans des oeufs embryonnés de 11 jours, selon la méthode d'Arora et al. (1973 et 1985), une électrophorèse sur un gel de polyacry lamide en présence de SDS a permis de vérifier la pureté des protéines virales présentes dans les suspensions virales. Cette technique a non seulement permis de constater que le profil polypeptidique des deux souches est similaire, mais elle a également permis l'évaluation de la Mr de la protéine M1 à environ 28 kDa, et ce pour les deux souches virales (Figure 3).

L'analy se comparative de la séquence de la souche FLAMSI88 avec les séquences nucléotidiques des clones, obtenus suite au clonage dans le vecteur plasmidique pCR2.1, a permis de constater que le gène de la protéine M pour les souches SwQc81 et SwQc91 demeure intact. En effet, tous les clones possèdent 1027 nucléotides, il n'y a donc aucune délétion d'observée (Figure 6). Bien que la colonie C47 de la souche SwQc81 possède un nucléotide différent à la position #649 de la séquence nucléotidique (Figure 6), cette mutation est silencieuse puisque l'aa correspondant, situé à la position #208 de la séquence en aa de la protéine M1 (Figure 7), n'est pas muté suite à la traduction. Les séquences en aa de chacun des clones de la souche SwQc91 ont également été comparées avec les séquences en aa des

clones de la souche SwQc81, et ce pour les protéines M1 et M2. À cause du taux de mutation engendré par la réaction de transcription inverse, impliquant la synthèse de l'ADNc à partir de l'ARN, trois clones provenant de trois réactions de transcription inverse différentes ont été séquencés pour chaque souche afin de s'assurer que les changements n'étaient pas simplement dus à une erreur attribuable à l'enzy me transcriptase inverse.

L'analy se comparative des séquences en aa a permis d'observer 2 changements en aa pour la protéine M1 de la souche SwQc91, démontrant ainsi une homologie de 99,8% entre les deux souches. Les changements ont été observés aux positions #4 (P est devenu L) et #205 (V est devenu I) (Figure 7, Tableau I). Puisque les aa impliqués dans les changements sont de même polarité que ceux de la souche SwQc81, parce que les chaînes latérales des aa demeurent hydrophobes (Rawn, 1990), les substitutions sont considérées comme silencieuses car elles ne risquent pas de changer l'hydrophobicité de la protéine M1 (Ito et al., 1991). En ce qui concerne la protéine M2, il a été possible d'observer 5 changements en aa pour la souche SwQc91, pour une homologie de 94,8% entre les deux souches. Les changements ont été observés aux positions #4 (P est devenu L), #16 (G est devenu E), #21 (D est devenu G), #54 (R est devenu C) et #95 (E est devenu G) (Figure 8, Tableau I). Il est bien connu que les propriétés des chaînes latérales des aa déterminent la conformation et la fonction des protéines (Rawn, 1990). Contrairement à la protéine M1, il est possible d'observer un changement de polarité pour 4 des 5 changements en aa notés pour la protéine M2 de la souche SwQc91. En effet, à la position #16 il est possible de noter que l'aa G, qui possède une chaîne latérale hy drophobe, est remplacé par un aa (E) possédant une chaîne latérale acide et hydrophile, alors qu'aux positions #21, #54 et #95 il est possible de constater que les aa de la souche SwQc81 possèdent tous des chaînes latérales hydrophiles. Ces dernières sont acides dans le cas des aa D et E alors qu'elle est basique dans le cas de l'aa R. Il est également possible de noter que les aa de la souche SwQc81 sont tous remplacés par des aa possédant une chaîne latérale hy drophobe dans le cas de la souche SwQc91 (Figure 8, Tableau I), sauf dans le cas de l'aa situé à la position #16. Cependant, les études réalisées au cours de cette expérience ne permettent pas de savoir si ces changements ont un effet sur la conformation des épitopes ou sur les différentes fonctions de la protéine M2 pour la souche SwQc91.

À partir des changements observés, le taux de mutation (nombre de changements en aa par résidu par année) a été calculé pour chaque protéine de la souche SwQc91. Puisque les protéines ne possèdent pas le même nombre d'aa, le taux a été calculé comme si chaque protéine était composée de 100 aa (Annexe 2) (Ito et al., 1991). Le taux de mutation a été évalué à  $0.8 \times 10^{-3}$  ce qui représente un pourcentage de variation de 0.08% pour la protéine M1 et à 5,15X 10<sup>-3</sup> (pour un pourcentage de variation de 0,51%) pour la protéine M2 (Tableau I). Les taux obtenus pour la souche SwQc91 ont été comparés avec ceux retrouvés dans la littérature pour les souches d'influenza porcin, isolées entre 1930 et 1990. Ainsi, tel que rapporté par Ito et al. (1991), le taux de mutation pour la protéine M1 a été évalué à 0.16 X 10<sup>-3</sup> (0.016% de variation) changements en aa par résidu par année, alors que dans le cas de la protéine M2 ce dernier a été évalué à 1,43 X 10<sup>-3</sup> (0,14% de variation). Compte tenu de l'écart observé entre les taux obtenus pour les protéines de la souche SwQc91 et ceux rapportés dans la littérature, les taux de mutation de chaque protéine de la souche SwQc91 ont été calculés une seconde fois mais cette fois-ci en les comparant avec les séguences en aa des souches d'influenza (H1N1) porcin utilisées par Ito et al. (1991) et isolées durant la même période. Il a été possible de noter 2 changements en aa pour la protéine M1 alors que 6 changements en aa ont pu être observés pour la protéine M2, pour un taux de mutation évalué à 0,1X10<sup>-3</sup> (0,01% de variation) et 1X10<sup>-3</sup> (0,1% de variation) respectivement (Tableau II). La même comparaison a été effectuée avec SwQc81 et il a été possible de noter 2 et 3 changements en aa, pour un taux de mutation évalué à 0,1X10<sup>-3</sup> (0,01% de variation) et à 0,5X10<sup>-3</sup> (0,05% de variation) pour les protéines M1 et M2 respectivement (Tableau II). Malgré qu'aucune conclusion ne puisse être tirée en se basant seulement sur les taux de mutation calculés pour les souches SwQc81 et SwQc91 puisqu'ils sont similaires à ceux rapportés dans la littérature (Ito et al., 1991), il est possible de constater un plus grand nombre de changements en aa pour la protéine M2 de SwQc91 comparativement à SwQc81, lorsque ces dernières sont comparées avec les souches d'influenza porcin (Tableau II). Ceci semble suggérer que SwQc91 diffère non seulement de SwQc81 mais également des autres souches d'influenza porcin retrouvées en Amérique du Nord. De plus, les taux de mutation calculés pour SwQc81 et SwQc91, en accord avec la littérature, indiquent que la protéine M2 évolue plus rapidement que la protéine M1. Ceci peut s'expliquer par la localisation de la protéine M2. En effet, puisqu'elle possède une partie externe, cette protéine est plus sensible aux changements du milieu, elle subit donc une pression immunitaire plus élevée que la protéine M1, qui elle est située à l'intérieur de la membrane virale (Gotch et al., 1987; Ito et al., 1991).

Si l'on se réfère à nouveau au pourcentage de variation obtenu pour la protéine M2 de SwQc91 (0,51%) (Tableau I), suite à la comparaison avec la séquence en aa de la souche SwQc81, il est possible de constater qu'il est similaire à celui de la protéine la plus variable du virus; la protéine HA (0,4-0,48%) (Luoh et al., 1992). Ceci est étonnant car bien que la protéine M2 possède un domaine externe elle est quand même considérée comme une protéine relativement stable comparativement aux autres gly coprotéines de surface, HA et NA, du virus influenza (Ito et al., 1991; Slepushkin et al., 1995). Le taux de mutation obtenu pour la protéine M2 de la souche SwQc91 ne semble pas reflèter la tendance observée depuis 1965. En effet, depuis 1965 les souches d'influenza porcin de sous-type H1N1 sont caractérisées par une grande stabilité antigénique (Sheerar et al., 1989; Noble et al., 1993) et génétique (Luoh et al., 1992; Noble et al., 1993). De plus, les différentes souches d'influenza porcin n'ont pas subi ou ont peu subi de pression immunitaire (Shærar et al., 1989; Noble et al., 1993; Bikour et al., 1995). L'hypothèse émise par Olsen et al. (1993) suggérant qu'une souche virale peut être présente pendant un an dans un endroit géographique restreint (une seule ferme ou une partie de continent) ainsi que la démonstration faite par Bikour et al. (1995) de l'existence de plusieurs de ces souches virales au Québec, toutes différentes et circulant durant la même période, pourraient expliquer les différences génomiques observées entre les souches SwQc81 et SwQc91.

On pourrait également tenter d'expliquer les différences génomiques entre les deux souches par l'action de la polymérase virale. Il est bien connu que la polymérase à ARN, qui est impliquée dans la réplication virale, est incapable de corriger ses erreurs de lecture, donc elle pourrait contribuer à l'apparition de nouveaux mutants génomiquement stables (Rocha et al., 1991; Domingo et al., 1993). Cependant, puisque les mutations répertoriées, à la fois pour la protéine M1 et la protéine M2, ne sont pas aléatoires car toutes les séquences obtenues pour les différents clones de la souche SwQc81 montrent les mêmes mutations aux mêmes positions, la même observation s'applique pour la souche SwQc91 (Figures #7 et #8).

Les erreurs possibles commises par la polymérase ne semblent donc pas expliquer les différences génomiques observées entre les deux souches. Des études réalisées sur la fidélité de cette enzyme *in vitro* ont démontré que le taux d'erreurs est estimé entre 1 erreur par 300 nucléotides incorporés et 1 erreur par environ 30 000 nucléotides incorporés (Roberts *et al.*, 1989). L'introduction de ces mutations par l'enzy me transcriptase inverse, lors de l'étape de synthèse de l'ADNc de la protéine M, ne semble pas non plus expliquer les résultats obtenus, puisque les manipulations ont été effectuées à trois reprises et que les résultats ont été reproductibles pour les trois réactions de transcription inverse, les mêmes mutations ay ant été répertoriées pour les trois clones des deux souches virales.

Les mutations auraient pu également se produire lors de l'étape d'amplification de l'ADNc. En effet, les paramètres expérimentaux comme le nombre de cycles utilisés, les températures d'hybridation et d'élongation ainsi que le milieu réactionnel auraient pu affecter la transcription de l'ADNc au cours de l'amplification. De plus, l'utilisation d'une ADN polymérase au cours de la réaction aurait pu être responsable des mutations observées, puisque tout comme la transcriptase inverse cette enzyme peut engendrer un taux d'erreurs estimé à plus d'une erreur par 5000 nucléotides (Kunkel, 1985), tout comme l'enzy me Taq polymérase dont le taux d'erreurs par cycle de PCR est estimé à 1/5000 (Saiki et al., 1988). Cependant, ceci ne semble pas être le cas dans cette expérience. Les modifications des séquences génomiques du gène de la protéine M ainsi que l'altération des caractéristiques biochimiques des aa qui ont été observées pourraient être attribuables à la pression exercée par la cellule hôte lors des passages du virus dans les oeufs embry onnés, ce qui aurait pour effet de favoriser l'apparition de variants antigéniques (Roberston et al., 1987; Wood et al., 1989). Cependant, des études génomiques réalisées pour les souches IAF-Klop et SwQc91, dans le laboratoire du docteur Arora, avec la protéine NA provenant des virus inoculés dans des oeufs embryonnés ainsi que sur un feuillet confluent de cellules MDCK, ont démontré que les mutations obtenues pour chaque souche étaient les mêmes.

Les études réalisées sur la protéine HA (Rekik et al., 1994; Arora et al., 1997a) et sur la protéine NA (Arora et al., 1997b) jumelées aux résultats obtenus dans la présente étude, concernant la protéine M2 démontrent que les gènes de ces trois protéines, provenant de la

souche SwQc91 associée à une nouvelle pathologie (Dea et al., 1992b), ont tous subi des changements génomiques considérables, lorsque comparés avec les gènes des souches classiques d'influenza porcin. Ces observations sont en accord avec une étude réalisée par Rekik et al. (1994) sur l'empreinte de l'ARN génomique. Il a démontré qu'il existait des divergences génomiques considérables entre SwQc91 et d'autres souches classiques d'influenza porcin, incluant SwQc81, pouvant impliquer plus d'un gène.

Le rôle essentiel de la protéine HA dans le contrôle de la virulence ainsi que dans la pathogénicité (Shaw et al.,1992) a bien été démontré tout comme le fait que la virulence est déterminée par plus d'un gène. En fait, la virulence dépend d'une constellation de gènes (Sweet et Smith, 1980). Il est intéressant de constater que la protéine M2, qui est responsable de la maturation de la protéine HA (Sugrue et al., 1990), a non seulement subi des changements génomiques considérables mais qu'elle a un taux de mutation comparable à celui observé pour la protéine HA, lorsque comparée avec SwQc81. Il se pourrait que la protéine M2 soit impliquée dans la pathogénicité associée au variant SwQc91. Cependant, ceci n'est qu'une hy pothèse qu'il faudrait démontrer.

Le second objectif visait à produire la PMR de la souche SwQc91 dans un vecteur d'expression procary otique. Les résultats ont démontré que l'expression de la PMR dépendait de la température à laquelle s'effectuait les manipulations, puisqu'elle n'a pu être détectée qu'à partir de 33°C et de 37°C (Figure 12A). De plus, même si la PMR a pu être produite avec une quantité de 0,5 mM d'IPTG il a été possible de noter que la production optimale de PMR pouvait être obtenue en utilisant 1 mM d'IPTG, ce qui semble démontrer que l'expression de la protéine recombinante est également dépendante de la quantité d'IPTG utilisée (Figure 12B). L'expression n'a pas été induite avec une quantité plus élevée d'IPTG car dans le guide foumi par le manufacturier il était recommandé d'utiliser une quantité maximale de 1 mM, puisque ce produit devient toxique pour la cellule lorsqu'il est utilisé en trop grande quantité (Novagen, 1992). L'expression de la PMR dépend également du temps d'induction. Cette production peut être détectée après 30 min d'induction et il a été possible de noter que la protéine devient une composante majeure de la suspension bactérienne après 4 heures d'induction et cette production semble atteindre un plateau après 12 heures

Suite à l'induction, il a été possible d'observer que la PMR était, en partie, enfermée dans les corps d'inclusion de la bactérie (Figure 10), tout comme c'était le cas dans les expériences réalisées par Watanabe et al. (1996) qui ont utilisé le même vecteur parental et les mêmes cellules compétentes. Afin de tenter de récupérer une plus grande quantité de PMR des corps d'inclusion de la bactérie, certains traitements impliquant l'urée, le thiocy anate de guanidine et le SDS ont été appliqués, suite à la sonication de la suspension bactérienne. En ce qui concerne l'étude effectuée par Watanabe et al. (1996), l'utilisation de l'urée a permis la solubilisation des corps d'inclusion de la bactérie et la récupération d'environ la moitié de la quantité de protéine produite. Dans la présente étude, le seul résultat qui soit présenté est relié à l'utilisation du SDS tel que suggéré par Cardamone et al. (1995) et Rudolph et Lilie (1996), puisqu'il il est le seul qui se soit avéré en partie efficace, car environ 30% de la PMR a pu être libérée des corps d'inclusion (Figure 11). En comparant le rendement obtenu suite à la sonication (Figure 10) à celui obtenu avec le SDS, précédé d'une sonication (Figure 11), il semble que la concentration de SDS utilisée n'ait pas permis de récupérer une plus grande quantité de PMR. Bien que le traitement impliquant le SDS devrait être amélioré, il semble que celui-ci ne dénature pas la protéine car suite à la solubilisation et à la purification il est possible de noter la présence d'une bande ayant une Mr estimée à 28 kDa, à l'aide d'un gel de polyacry lamide de 12% en présence de SDS (Figures 11 et 14). De plus, l'électroélution suivie d'une concentration a permis d'obtenir une quantité appréciable de PMR de 2,5 mg/ml par 200 ml de suspension bactérienne. Lors de cette étude, il a été possible d'obtenir une concentration de 9,6 mg/ml de protéines virales purifiées et concentrées par 2,5 litres de liquide allantoïque infecté avec le virus influenza et recueilli à partir de 300 oeufs embryonnés. Au total, si l'on considère que la protéine M1 représente entre 30 et 46% du contenu en protéines virales, Schulze (1973) tel que rapporté par Bucher et al. (1987), cela représente entre 2,88 et 4,4 mg/ml de protéine M1 purifiée. Il est donc possible de recueillir une quantité de PMR similaire, suite à l'électroélution, en ne récupérant que 30% de la production. Ceci permet de constater l'efficacité de l'électroélution, démontrée dans d'autres expériences notamment celle impliquant la protéine M1 du virus influenza réalisée par Donofrio et al. (1996). L'électroélution devient une technique avantageuse compte tenu des coûts peu élevés qui lui sont associés comparativement à une production de virus dans des oeufs embry onnés.

Le troisième objectif visait tout d'abord à vérifier l'antigénicité ainsi que l'immunogénicité de la PMR. Un immunobuvardage à l'aide d'un sérum polyclonal anti-SwQc91 a été effectué. Les résultats obtenus ont permis de noter la présence d'une bande ayant une Mr de 28 kDa dans les puits correspondants à la PMR libérée des corps d'inclusion ainsi que dans celui contenant la PMR électroéluée (Figure 15). Il ne semble pas y avoir de protéine bactérienne de Mr identique à la PMR puisqu'aucune bande à 28 kDa n'est apparue dans le puit contenant la suspension bactérienne induite à l'IPTG (Figure 15). Ces résultats semblent démontrer que bien que la PMR ait été traitée avec du SDS, considéré comme un puissant détergent, et soumise à des températures élevées lors de la solubilisation des corps d'inclusion, elle a conservé son antigénicité. Ceci vient corroborer les résultats obtenus par le groupe de Bucher et al. (1987) qui démontraient la grande stabilité de la protéine M1, même lorsqu'elle était soumise à des températures élevées (jusqu'à 100°C) pendant 2 heures ou qu'elle était traitée avec des détergents comme le SDS. Il est possible de constater que l'expérience a été réalisée en utilisant le plasmide recombinant pET/M induit pendant 2, 4 et 8 heures (Figure 15) et non celui induit pendant 12 heures, correspondant aux conditions optimales évaluées précédemment. Le plasmide pETM contenu dans la suspension bactérienne induite 12 heures, a été conservé pour les expériences reliées à l'immunisation des souris et le test ÉLISA indirect et ce afin d'utiliser la même production de PMR.

Les expériences réalisées jusqu'à maintenant ne permettent pas de tirer de conclusions quant à l'intégrité des épitopes de la PMR. Afin d'y parvenir un immunobuvardage, réalisé à l'aide de 5 AcMo utilisés au préalable par Ye et al. (1987 et 1989) afin de caractériser les 4 épitopes de la protéines M1 de la souche d'influenza WSN/33, a été effectué. Les figures 16A à 16E représentent les différents résultats obtenus pour chaque épitope. L'étude de ces résultats a permis de constater dans tous les cas l'apparition d'une bande de 28 kDa dans les puits contenant respectivement la PMR solubilisée, la PMN électroéluée et la PMR électroéluée. Dans les puits contenant la

suspension bactérienne exprimée à l'aide d'IPTG, et contenant ou non le vecteur parental pET21(a), aucune bande de 28 kDa n'a pu être révélée suite à la réaction avec chacun des 5 AcMo (Figures 16A à 16E), ce qui semble démontrer que la bande de 28 kDa représente bien la protéine M1. Puisque les 5 AcMo ont réagi à la fois avec la PMN et avec la PMR et que la migration sur le gel de polyacry lamide est similaire pour les deux protéines (Figures 16A à 16E), il est possible de supposer que les quatre épitopes sont demeurés intègres, même après les différents traitements auquels a été soumise la PMR. Tout comme l'immunobuvardage réalisé avec le sérum polyclonal et pour les mêmes raisons, le plasmide recombinant pET/M utilisé n'est pas celui ay ant été induit pendant 12 heures.

Certaines fonctions sont associées à certains épitopes de la protéine M1. Les résultats obtenus au cours de l'étude réalisée à l'aide des 5 AcMo permettent de supposer que dans le cas de la PMR ces fonctions ne sont pas affectées. Ce qui implique que, tout comme pour la PMN, l'épitope #1 de la PMR serait associé avec un site responsable de la liaison de la protéine avec la membrane lipidique, alors que l'épitope #2 serait impliqué dans l'activité d'inhibition de la transcription du complexe de la RNP lors de la liaison de la protéine M1 à ce dernier. Il se pourrait également qu'une région correspondant à une partie de l'épitope #4 (aa 80-109) soit également impliquée dans l'activité d'inhibition de la transcription (Ye et al., 1989). De plus, le fait que les résultats obtenus pour la séquence en aa de la protéine M1 de la souche SwQc91 ne démontrent aucun changement dans les régions représentant les différents épitopes (épitope #1: aa 46-89; épitope #2: aa 129-164; épitopes #3 et #4: aa 45-119), (Figure 7) constitue une preuve supplémentaire qui tend à démontrer l'intégrité des épitopes de la protéine M1 et le maintien probable de leurs fonctions.

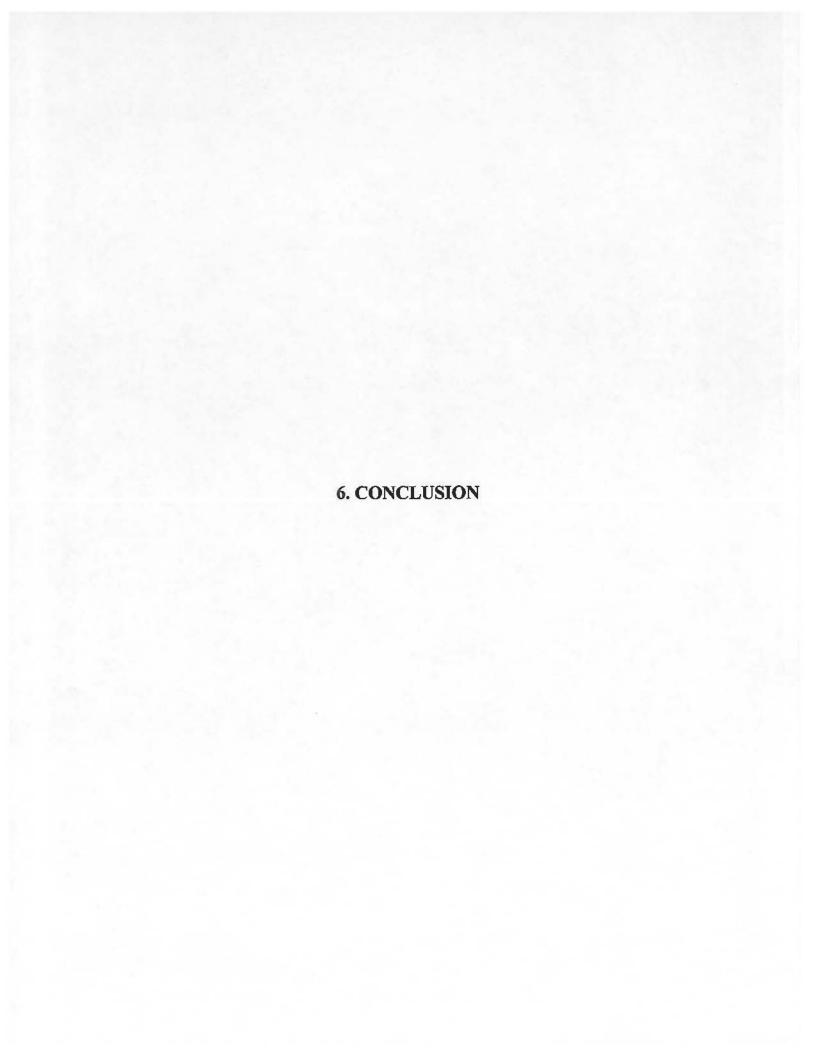
Le troisième objectif de cette étude visait également à vérifier l'immunogénicité de la PMR en évaluant la réponse humorale engendrée par celle-ci. Pour ce faire, le titre en Ac obtenu pour chaque groupe de souris, immunisées respectivement avec du PBS, la PMN, la PMR et le virus complet SwQc91, a été évalué à l'aide du test ÉLISA indirect et ce 12 jours après chaque immunisation. Les résultats obtenus ont permis de noter des différences entre les titres en Ac obtenus pour chaque groupe selon que l'Ag adsorbé ait été le virus complet SwQc91 purifié ou la PMR électroéluée (Figures 17A et 17B). En effet, ce n'est que suite au

troisième prélèvement que des titres en Ac anti-PMN (128 000) et anti-PMR (64 000) relativement élevés ont pu être détectés, alors que pour les Ac anti-SwQc91 un titre de 32 000 a pu être détecté dès le premier prélèvement lorsque l'Ag utilisé était le virus complet (Figure 17A). En ce qui concerne les résultats obtenus lorsque l'Ag utilisé était la PMR, des titres élevés en Ac anti-PMR (128 000) et anti-PMN (256 000) ont pu être détectés dès le second et le troisième prélèvement (Figure 17B).

Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que la protéine M1 est située à l'intérieur de la membrane bilipidique (Lamb et Choppin, 1983) et que cette membrane doit être traitée avec des détergents afin d'exposer les sites antigéniques de la protéine pouvant réagir avec les Ac présents dans le sérum; contrairement à la PMR purifiée qui est susceptible d'exposer plus facilement ses sites antigéniques, en autant que sa production dans le système procary ote ainsi que les différents traitements auxquels elle a été soumise n'aient pas trop changé la conformation des épitopes (Ausebel et al., 1995). En effet, il est possible de constater que les Ac, pour les groupes de souris immunisées avec la PMR purifiée et la PMN purifiée, en plus d'être détectés plus rapidement dans le sérum avaient des titres plus élevés lorsque la PMR était utilisée comme Ag (Figure 17B). Cependant, le contraire a pu être observé lorsque c'était le virus qui était l'Agutilisé. Le fait que les titres en Ac du groupe immunisé avec le virus SwQc91 soient plus élevés lorsque le virus est adsorbé peut s'expliquer par la présence de la majorité des protéines virales lors de l'immunisation et ce contrairement aux autres groupes (Figure 17A). Ceci peut également expliquer que les titres en Ac soient plus faibles pour le groupe immunisé avec le virus lorsque c'est la PMR qui est adsorbée dans le fond des puits (Figure 16B), parce que cette dernière ne pourra détecter que la présence de la protéine M1 dans le sérum. Le fait que le titre obtenu pour le groupe immunisé avec le PBS soit presque nul après chaque immunisation, que ce soit le virus ou la PMR qui soit adsorbé dans le fond des puits (Figures 17A et 17B), confirme que les Ac détectés dans le sérum des groupes de souris immunisées sont spécifiques à l'Ag utilisé lors de l'immunisation.

En plus de démontrer que la PMR est un bon immunogène, ces expériences démontrent également la grande sensibilité de la PMR comme Ag puisqu'en utilisant une

concentration de 1 µg/ml, il a été possible de détecter rapidement des titres élevés en Ac. Ceci vient corroborer les résultats obtenus par Bucher *et al.* (1987), qui en utilisant différentes concentrations de protéine M1 incluant 1 µg/ml, a été en mesure de détecter des titres en Ac anti-M1 et anti-virus s'élevant jusqu'à 40 000. Sa stabilité et sa sensibilité feraient de la PMR un outil intéressant à utiliser dans les tests de détection du virus influenza, d'autant plus que les propriétés hy drophobiques de la protéine M1 facilitent son adsorption aux plaques de polysty rène et ce même en présence de d'autres protéines (Bucher *et al.*, 1987).



L'apparition de maladies respiratoires chroniques chez les porcs a mené à l'identification d'une nouvelle souche d'influenza porcin (H1N1) au Québec, nommée A/Sw/Québec/5393/91 (SwQc91). Les études réalisées, dans le laboratoire du docteur Arora, sur les protéines externes HA et NA ont démontré que ces dernières subissent plusieurs changements au niveau génomique. Il existe une troisième protéine transmembranaire, la protéine M2 codée par le gène de la protéine M, qui possède une partie externe. De plus, une seconde protéine, la protéine M1 située à l'intérieur du virion est également codée par le gène de la protéine M. L'étude de la protéine M permettait donc de comparer à la fois les changements génomiques internes et externes associés à la nouvelle souche SwQc91. De plus, une revue de la littérature sur la production des protéines dans des systèmes d'expression procary otiques et eucary otiques permettait d'envisager l'utilisation de la PMR dans le but d'induire une immunité chez l'hôte.

Cette étude visait l'atteinte des objectifs suivants: 1) Comparer les séquences génomiques des protéines M1 et M2 pour les souches SwQc81 et SwQc91; 2) Produire la PMR dans un vecteur d'expression procaryote; 3) Évaluer l'antigénicité et l'immunogénicité de la PMR.

Suite à l'étude des séquences en aa, il a été possible de conclure que la protéine M2 de la souche SwQc91 est celle qui a subi les changements génomiques les plus considérables, comparativement à la protéine M1 qui a subi elle peu de changements. Lorsque comparée avec la protéine M2 de la souche SwQc81, il a été possible d'observer que le taux de mutation de la protéine M2 de la souche SwQc91 était comparable à celui de la protéine la plus variable du virus influenza; la protéine HA.

En ce qui concerne l'expression de la protéine M1 dans un vecteur procaryote, les résultats ont démontré qu'il était possible d'exprimer la protéine et que l'expression de cette dernière semblait dépendante de la température, de la quantité d'IPTG utilisée ainsi que du temps. Il a également été possible d'observer que la PMR était présente en majeure partie dans les corps d'inclusion de la bactérie. Bien que les corps d'inclusion aient été traités avec du SDS, il n'a pas été possible de libérer une plus grande quantié de PMR sous forme

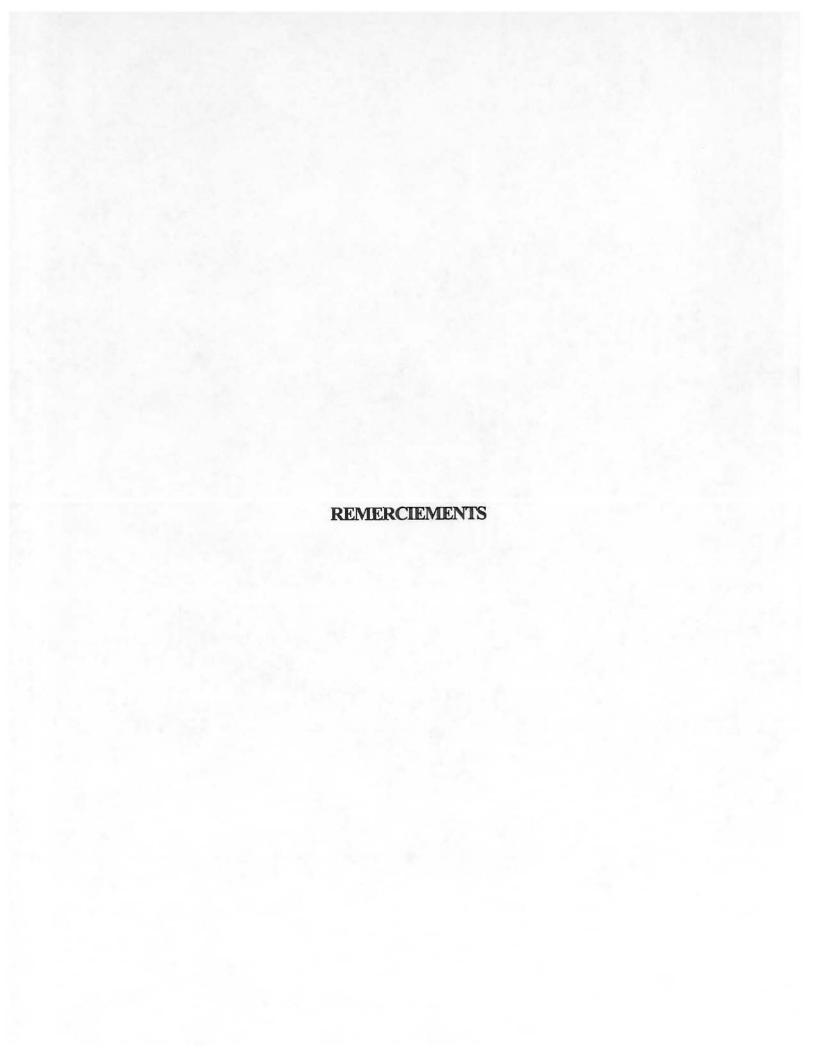
soluble, ce qui suggère que ce traitement doit être amélioré.

Les résultats obtenus suite à l'étude sur l'antigénicité de la PMR ont démontré que les différents traitements imposés à la PMR ne semblent pas avoir affecté l'intégrité de ses quatre épitopes. Ce qui semble démontrer que la PMR demeure stable même après traitement avec le SDS.

Les résultats obtenus suite à l'ÉLISA indirect permettent de conclure que la PMR est un bon immunogène puisqu'elle semble engendrer chez la souris une réponse immunitaire humorale qui est similaire à celle engendrée par la protéine M native. Ces expériences démontrent également la grande spécificité de la PMR comme Ag puisqu'en utilisant une concentration de 1 µg/ml, il a été possible de détecter rapidement des titres élevés en Ac.

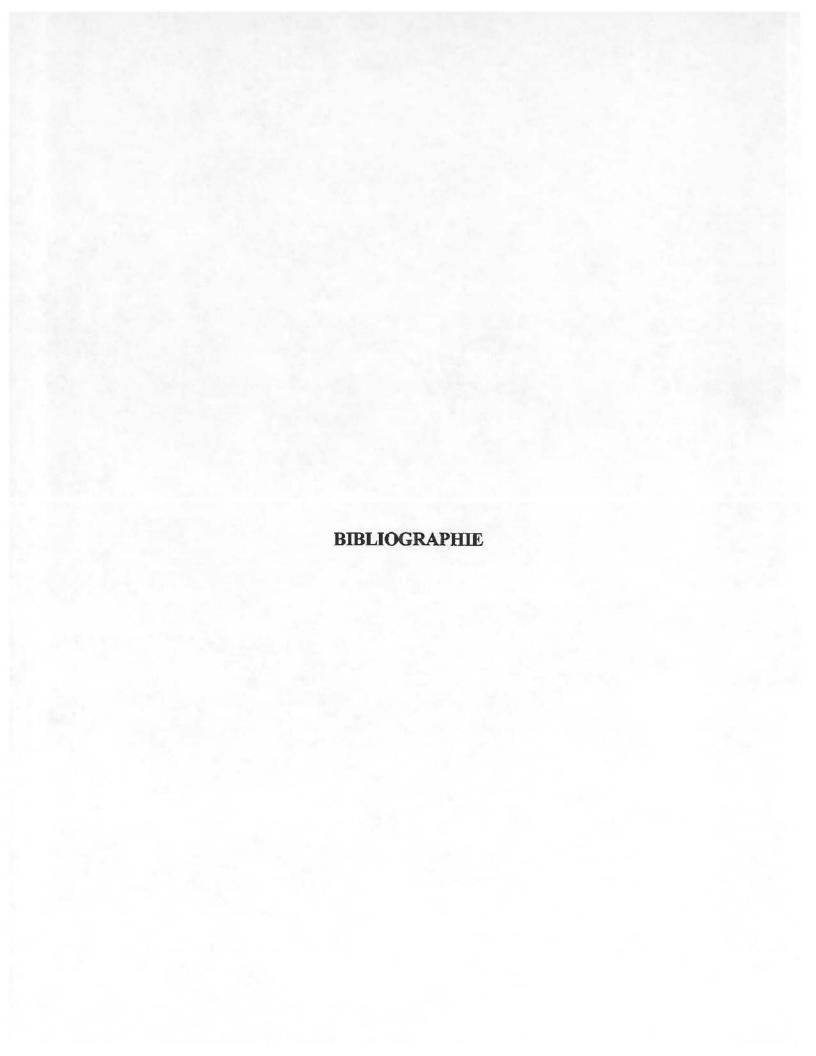
Les différents résultats obtenus suite à cette étude semblent indiquer que la PMR produite est similaire à la protéine M native. Puisqu'il a été démontré que la PMR engendre une réponse humorale, il serait également intéressant de vérifier si elle peut engendrer une réponse immunitaire cellulaire comparable à celle engendrée par la protéine M native. Il serait aussi intéressant de comparer la protection foumie par chacune des protéines suite à l'immunisation. La PMR purifiée pourrait également servir au développement d'une trousse diagnostique permettant de détecter la présence du virus influenza de type A chez les populations porcines.

La grande variation génomique observée pour la protéine M2 de la souche SwQc91 ne peut être banalisée. En effet, puisque cette protéine est responsable de la maturation de la protéine HA, elle-même liée à la pathogénicité ainsi qu'à la virulence, et puisque que le taux de mutation obtenu pour la protéine M2 de la souche SwQc91 est comparable à celui de la protéine HA, il serait intéressant d'entreprendre des études qui permettraient de vérifier si la protéine M2 a un rôle à jouer dans la nouvelle pathologie associée au variant SwQc91. Finalement, il serait intéressant de chercher à élargir davantage les connaissances, qui sont à l'heure actuelle bien minces, sur les différents épitopes identifiés pour la protéine M2.



J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le professeur Jit Arora pour sa disponibilité, ses conseils, pour le soutien financier apporté tout au long de maîtrise et pour sa patience. Il a su développer mon esprit critique et surtout ma patience. J'aimerais exprimer ma gratitude à la fondation de l'Institut Armand-Frappier ainsi qu'au CORPAQ pour le soutien financier apporté tout au long de mes études graduées. De plus, j'aimerais remercier le docteur Zipping Ye qui travaille au NIH pour les AcMo. J'aimerais également remercier Marc Henrichon pour son aide technique et ses conseils.

Finalement, j'aimerais particulièrement remercier mes parents pour leur support (autant financier que moral) et pour leur appui tout au long de ma maîtrise.



- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. et Pober, J.S. 1994. Cellular and molecular immunology, 2<sup>e</sup> édition. Montréal, W.B. Saunders Company, 457 pages.
- Alonso-Caplen, F.V., Nemeroff, M.E. et Krug R.M. 1992. Nucleocytoplasmic transport: the influenza virus NS1 protein regulates the transport of spliced NS2 mRNA and its precursor NS1 mRNA. Genes and Develop. 6: 225-267.
- Andrew, M.E., Coupar, B.E.H., Boyle, D.B. et Ada, G.L. 1987. The roles of influenza virus haemagglutinin and nucleoprotein in protection: analysis using vaccinia virus recombinant. Scand. J. Immunol. 25: 21-28.
- Antibodies. 1988. The laboratory manuel. Harlow, E.D., Lane, D. Cold Sprong Harbor Laboratory.
- Air, G.M., Laver, W.G. et Webster, R.G. 1987. Antigenic variation in influenza viruses. Contrib. Microbiol. Immunol. 8: 20-59.
- Arora, D.J.S., Pavilanis, V. et Robert, P. 1973. Two step centrifugation method. A simplification of the density-gradient procedure for the purification of influenza virus. Can. J. Microbiol. 19: 633-638.
- Arora, D.J.S., Houde, M., Justewicz, D.M. et Mandeville, R. 1984. In vitro enhancement of human natural cell-mediated cytotoxicity by purified influenza glycoproteins. J. Virol. 52: 839-845.
- Arora, D.J.S., Tremblay, P., Bourgault, R. et Boileau, S. 1985. Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid. Anal. Biochem. 144: 189-192.
- Arora, D.J.S. et Houde, M. 1991. Modulation of murine macrophage responses stimulated with influenza gly coproteins. Can. J. Microbiol. 38: 188-192.
- Arora, D.J.S. 1993. Administration of inactivated and detergent-treated influenza virus to mice before virus challenge reduces mortality. J. Med. Virol. 41: 85-89.
- Arora, D.J.S. et Henrichon, M. 1994. Superoxide anion production in influenza protein-activated NADPH oxydase of human polymorphonuclear leukocyte. J. Infect. Dis, 169: 1129-1133.
- Arora, D.J.S., N'Diaye, M et Dea, S. 1997a. Genomic study of hemagglutinins of swine influenza (H1N1) viruses associated with acute and chronic respiratory diseases in pigs. Arch. Virol. **142**: 401-412.
- Arora, D.J.S., Tijssen, P., Dea, S. et Henrichon, M. 1997b. Complete sequences of the neuraminidase genes of swine influenza viruses (H1N1) associated with respiratory disease in pigs. Virus Genes 14(3): 251-254.

- Ausebel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. et Struhl, K. 1995. Short protocols in molecular biology. Copyright 1995, John Wiley and Sons.
- Austin, R. et Bystrom, J. 1991. Proliferative and necrotizing pneumonia in Manitoba. Can. Vet. J. 32: 371.
- Barcena, J., Ochoa, M., Delaluna, S., Melero, J.A., Nieto, A., Ortin, J. et Portela, A. 1994. Monoclonal antibodies against virus PB2 and NP polypeptides interfere with initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. J. Virol. 68: 6900-6909.
- Beaton, A.R. et Krug R.M. 1986. Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 6282-6286.
- Bikour, M.H., Cornaglia, E., Weber, J.M. et Elazhary, Y. 1994. Antigenic characterization of an H3N2 swine influenza virus isolated from pigs with proliferative and necrotizing pneumonia in Quebec. Can. J. Vet. Res. 58: 287-290.
- Bikour, M.H., Frost, E., Deslandes, S., Talbot, B. et Elazhary, Y. 1995. Persistence of a 1930 swine influenza A (H1N1) virus in Quebec. J. Gen. Virol. 76: 2539-2547.
- Black, R.A., Rota, P.A., Gorodkova, N., Cramer, A., Klenk, H-D et Kendal, A.P. 1993a. Production of the M2 protein of influenza A virus in insect cells is enhanced in the presence of amantadine. J. Gen. Virol. 73: 1673-1677.
- Black, R.A., Rota, P.A., Gorodkova, N., Klenk, H-D et Kendal, A.P. 1993b. Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells. J. Gen. Virol. 74: 143-146.
- Briedis, D.L., Lamb, R.A. et Choppin, P.W. 1982. Sequences of RNA segment 7 of influenza virus genome: partial amino acid homology between the membrane proteins (M1) of influenza A and B viruses and conservation of the second open reading frame. Virology 116: 581-588.
- Brown, I.H., Manvell, R.J., Alexander, D.J., Chakraverty, P., Hinshaw, V.S. et Webster, R.G. 1993. Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. Vet. Rec. 132: 461-462.
- Brown, I.H., Ludwig, S., Olsen, C.W., Hannoun, C., Sholtissek, C., Hinshaw, V.S., Harris, P.A., McCauley, J.W., Strong, I. et Alexander, D.J. 1997. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. J. Gen. Virol. 78: 553-562.
- Bucher, D.J., Kharitonenkov, I.G., Wajeed Khan, M., Palo, A., Holloway, D. et Mikhail, A. 1987. Detection of influenza viruses through selective adsorption and detection of the M-protein antigen. J. Immunol. Met. 96:77-85

- Bui, M., Whittaker, G. et Helenius, A. 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. J. Virol. 70(12): 8391-8401.
- Bullough, P.A., Hughson, F.M., Skehel, J.J. et Wiley, D.C. 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. Nature 371: 37-43.
- Butterfield, W.K., Campbell, C.H., Webster, R.G. et Shortridge, K.F. 1978. Identification of a swine influenza virus (Hsw1N1) isolated from duck in Hong Kong J. Infect. Dis. 138: 686-689.
- Campitelli, L., Donatelli, I., Foni, E., Castrucci, M.R., Fabiani, C., Kawaoka, Y., Krauss, S. et Wbster, R.G. 1997. Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. Virology 232: 310-318.
- Cardamone, M., Puri, N.K. et Brandon, M.R. 1995. Comparing the refolding of recombinant porcine growth hormone from ures denatured state and from *Escherichia coli* inclusion bodies. Biochemistry **34:** 5773-5794.
- Castrucci, M.R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y. et Webster, R.G. 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. Virology 193: 503-506.
- Chambers, T.M., Hinshaw, V.S., Kawaoka, Y., Easterday, B.C. et Webster, R.G. 1991. Influenza viral infection of swine in the United States 1988-1989. Arch. Virol. 116: 261-265.
- Chomczynski, P. et Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem . 162: 156-159.
- Choppin, P.W. et Compans, R.W. 1975. The structure of influenza virus. Dans Kilbourne, E.D. The influenza viruses and influenza. New York Academic Press, pp 15-52.
- Ciampor, F., Thompson, C.A., Grambas, S. et Hay, A.J. 1992. Regulation of pH by the M2 protein of influenza A viruses. Virus Res. 22: 247-258.
- Cohen, J. 1997. The flu pandemic that might have been. Science 277: 1600-1601.
- Colman, P.M., Varghese, J.N. et Laver, W.G. 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature 303: 41-44.
- Colman, P.M. et Ward, C.W. 1985. Structure and diversity of influenza virus neuraminidase. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 114: 177-255.
- Concannon, P., Cummings, I.W. et Salser, W.A. 1984. Nucleotide sequence of the influenza virus A/USSR/90/77 hemagglutinin gene. J. Virol. 49: 276-278.

- Conseil canadien du porc. 1995. Revue canadienne de la recherche porcine. Édité par le Conseil canadien du porc, Ottawa. 174 pages.
- Cooney, E.L., et al. 1991. Safety and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV enveloppe glycoprotein. Lancet 337: 567-572.
- Davey, J., Dimmock, N.J. et Colman, A.. 1985. Identification of the sequence responsible for the accumulation of the influenza virus nucleoprotein in xenopus oocytes. Cell 40: 667-675.
- Davis, H.L., Michel, M.L., Mancini, M., Schleef, M. et Whalen, R.G. 1994. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the Hepatitis B virus surface antigen. Vaccine 12: 1503-1509.
- Davis, H.L., Brown, K.W. et Johnston, R.E. 1996. A viral vaccine that express foreign genes in lymph nodes and protects against mucosal challenge. J. Virol. 70: 3781-3787.
- Davis, H.L., Brazolot Millan, C.L., Mancini, M., McCluskie, M.J., Hadchouel, M., Comanita, L., Tiollais, P., Whalen, R.G. et Michel, M-L. 1997. DNA-based immunization against hepatits B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAgtransgenic mice. Vaccine 15(8): 849-852.
- Dea, S., Athanassious, R., Sauvageau, R.A. et Martineau, G.P. 1992a. Swine reproductive and respiratory syndrome in Quebec: Isolation of an envelopped virus serologically-related to lelystad virus. Can. Vet. J. 33: 801-808.
- Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageau, R., Montpetit, C. et Martineau, G.P. 1992b. Antigenic variation of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 380-392.
- de Boer, G.F., Black, W. et Osterhaus, D.M.E. 1990. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. Arch. Virol. 115: 47-61.
- Deck, R.R., Dewitt, C.M., Donnelly, J.J., Liu, M.A. et Ulmer, J.B. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. Vaccine 15: 71-78.
- Domingo, E., Diez, J., Martinez, M.A., Hernandez, J., Holguin, A., Borrego, B. et Mateu, M.G. 1993. New observations on antigenic diversification of RNA viruses: Antigenic variation is not dependent on immune selection. J. Gen. Virol. 74: 2039-2045.
- Donatelli, I., Campitelli, L., Castrucci, M.R., Ruggieri, A., Sidoli, L. et Oxford, J.S. 1991. Detection of two antigenic subpopulations of A (H1N1) influenza viruses from pigs: antigenic drift or interspecies transmission? J. Med. Virol. 34: 248-257.

- Donnelly, J.J., Friedman, A., Martinez, D., Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Motzel, S.L., Ulmer, J.B. et Liu, M.A. 1995. Predinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. Nature Med. 1: 583-587.
- Donnelly, J.J., Friedman, A., Ulmer, J.B. et Liu, M.A. 1997. Further protection against antigenic drift of influenza virus in a ferret model dy DNA vaccination. Vaccine 15(8): 865-868.
- Donofrio, J.C., Coonrod, J.D., Karathanasis, V. et Coelingh, K.V.W. 1986. Electroelution for purification of influenza A matrix protein for use in immunoassay. J. Virol. Met. 13: 107-120.
- Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R.W.H. et Baudin, F. 1997. Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal. J. Gen. Virol. 78: 1589-1596.
- Enami, K., Sato, T.A., Nakada, S. et Enami, M. 1994. Influenza virus NS1 protein stimulates translation of the M1 protein. J. Virol. 68(3): 1432-1437.
- Ertl, H.C.J. et Xiang, Z.Q. 1996. Genetic immunization. Viral Immunol. 9(1): 1-9.
- Easterday, B.C. 1986. Swine influenza In: Leman AD, Straw B, Glock RD, Mengeling WL, Penny RHC, Scholl E. Diseases of swine, 6<sup>e</sup> édition. Iowa State University Press, Ames, pp244-255.
- Fries, L.F., Dillon, S.B., Hildreth, J.E.K., Karron, R.A., Funkhouser, A.W., Friedman, C.J., Jones, C.S., Culleton, V.G. et Clements, M. 1993. Safety and immunogenicity of a recombinant protein influenza A vaccine in adult human volunteers and protective efficacity against wild-type H1N1 virus challenge. J. Infect. Dis. 167: 593-601.
- Fujisawa, S.H., Taniguchi, M., Zinnaka, Y. et Nomoto, K. 1987. Protective mechanisms against pulmonary infection with influenza virus. I. Relative contribution of polymorphonuclear leukocytes and of alveolar macrophages to protection during the early phase of intranasal infection. J. Gen. Virol. 88: 425-432.
- Gagnon, A.N., Boudreault, A., Marsolais, G., Lussier, G. et Marois, P. 1974. Maladies porcines à éthiologie virale dans la province de Québec. I. Influenza. Can.Vet.J. 15(11): 312-315.
- Ghendon, Y. 1990. The immune response to influenza vaccine. Acta Virol. 34: 295-304.
- Girard, C., Morin, M. et Elazhary, Y. 1992. Experimentally-induced porcine proliferative and necrotizing pneumonia with an influenza A virus. Vet. Res. 130: 206-207.
- Gorman, O.T., Bean, W.J., Kawaoka, Y. et Webster, R.G. 1990. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. J. Virol. 64(4): 1487-1497.

- Gotch, F., McMichael, A., Smith, G. and Moss, B. 1987. Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. J. Exp. Med. 165: 408-416.
- Gottschalk, A. 1957. The specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. Biochim. Biophys. Acta 23: 645-646.
- Gould, K.G., Scotney, H., Townsend, A.R., Bastin, J. et Brownlee, G.G. 1987. Mouse H-2k restricted cytotoxic T cells recognize antigenic determinants in both the HA1 and HA2 subunits of the influenza A/PR/8/34 hemagglutinin. J. Exp. Med. 166: 693-701.
- Guinea, R. et Carrasco, L. 1994. Influenza virus M2 protein modifiesmembrane permeability in *E. coli* cells. FEBS Lett. **343**: 242-246.
- Guo, Y.J., Jin, F.G., Wang P., Wang M. et Zhu, J.M. 1983. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. J. Gen. Virol. 64: 177-182.
- Hall, R.M. et Air, G.M. 1981. Variation in nucleotide sequences coding for the N-terminal regions of the matrix and nonstructural proteins of influenza A viruses. J. Virol. 38:1-7.
- Hankins, R.W., Nagata, K., Kato, A. et Ishihama, A. 1990. Mechanism of influenza virus transcription inhibition by matrix (M1) protein. Res. Virol. 141: 305-314.
- Henrichon, M. 1997. Expression de la sous-unité HA1 du gène de l'hémagglutinine du virus influenza A (H1N1) associé à la pneumonie proliférative et nécrosante. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec. 156 pages.
- Hiebert, S.W., Williams, M.A. et Lamb, R.A. 1986. Nucleotide sequence of RNA segment 7 of influenza B/Singapore/222/79: maintenance of a second large open reading frame. Virology 155: 747-751.
- Hinshaw, V.S., Bean, W.J., Webster, R.G. et Easterday, B.C. 1978. The prevalence of influenza viruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of influenza viruses from man and swine. Virology 84: 51-62.
- Hinshaw, V.S., Webster, R.G., Bean, W.J., Downie, J.C. et Senne, D.A. 1983. Swine influenza-like viruses in turkeys: potential source of virus for human? Science 220: 206-208.

- Hinshaw, V.S., Alexander, D.J., Aymard, M., Bachman, P.A., Easterday, B.C., Hannoun, C., Kida, H., Lipkind, M., MacKenzie, J.S., Nerome, K., Schild, G.C., Scholtissek, C., Senne, D.A., Shortridge, K.F., Skehel, J.J. et Webster, R.G. 1984. Antigenic comparisons of swine-influenza-like H1N1 isolates from pigs, birds and humans: an international collaborative study. Bulletin of the Wold Health Organization 62: 871-874.
- Holsinger, L.J. et Lamb, R.A. 1991. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. Virology 183: 32-43.
- Holsinger, L.J., Shaughnessy, M.A., Micko, A., Pinto, L.H. et Lamb, R.A. 1995. Analysis of the posttranscriptional modifications of the influenza virus M2 protein. J. Virol. 69(2): 1219-1225.
- Huang, T-S., Palese, P. et Krystal, M. 1990. Determination of influenza virus proteins required for genome replication. J. Virol. 64(11): 5669-5673.
- Hughey, P.G., Compans, R.W., Zebedee, S.L. et Lamb, R.A 1992. Expression of the influenza A virus M2 protein is restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. J. Virol. 66: 5542-5552.
- Hughey, P.G., Roberts, P.C., Holsinger, L.J., Zebedee, S.L., Lamb, R.A. et Compans, R.W. 1995. Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly. Virology 212: 411-421.
- Inglis, S.C. et Brown, C.M. 1981. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. Nucleic Acids Res. 9: 2727-2740.
- Inkster, M.D., Hinshaw, V.S. et Schultze, I.T. 1993. The hemagglutinins of duck and human H1 influenza viruses differ in sequence conservation and in gly cosylation. J. Virol. 67: 7436-7443.
- Ito, T., Gorman, O.T., Kawaoka, Y, Bean, W.J. et Webster, R.G. 1991. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. J. Virol. 65(10): 5491-5498.
- Jenner, E. 1798. An inquiry into the causes and effects of the variolae vaccinae, a disease discovered in some of the western counties of England, particularly Gloucestershire, and known by the name of the cow pox. Dans Classics of Medecine and Surgery. Éditions Camac, C.N.B, London.
- Johansson, B.E. et Kilbourne, E.D. 1996. Immunization with dissociated neuraminidase, Matrix, and nucleoproteins from influenza A virus eliminates cognate help and antigenic competition. Virology 225: 136-144.

- Jones, L., Ristow, S., Yilma, T. et Moss, B. 1986. Accidental human vaccination with vaccinia virus vaccine expressing nucleoprotein gene (letter). Nature 319: 543.
- Justewicz, D.M., Morin, M.J., Robinson, H.L. et Webster, R.G. 1995. Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. J. Virol. 69: 7712-7717.
- Kawaoka, Y. et Webster, R.G. 1988. Sequence requirements for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 324-328.
- Kendal, A.P., Goldfield, M., Noble, G.R. et Dowdle, W.R. 1977. Identification and preliminary antigenic analysis of swine influenza-like viruses isolated during an influenza outbreak at Fort Dix, New Jersey. J. Infect. Dis. 136: S381-385.
- Kilbourne, E.D., Laver, W.G., Schulman, J.L. et Webster, R.G. 1968. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. J. Virol. 2: 281-288.
- Kilbourne, E.D. 1987. Influenza. Plenum Medical Book Company. New York, 359 pages.
- Kida, H., Shortridge, K.F. et Webster, R.G. 1988. Origin of the hemagglutinin gene of H3N2 influenza viruses from pigs in China. Virology 162: 160-166.
- Klenk, H-D., Rott, R., Orlich, M. et Blodorn, J. 1975. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. Virology **68:** 426-439.
- Klenk, H-D. 1991. Orthomy xoviridae. Dans Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.I. et Brown, F. (eds.): Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses. New York: Springer Verlag Wien, pp 263-272.
- Koennecke, I., Boschek, C.B. et Scholtissek, C. 1981. Isolation and properties of a temperature-sensitive mutant (ts 412) of an influenza A virus recombinant with a ts lesion in the gene coding for the structural protein. Virology 110: 16-25.
- Kohn, M.A., Farley, T.A., Sundind, T.R., McFarland, L.M. et Arden, N.H. 1995. Three summertime outbreaks of influenza type A. J. Infect. Dis. 172: 246-249.
- Kunkel, T.A. 1985. The mutational specificity of DNA polymerase during in vitro synthesis. J. Biol. Chem. 260(9): 5787-5796.
- Kurtz, S., Luo, G., Hahnenberger, K.M., Brooks, C., Gecha, O., Ingalls, K., Numata, K-I. et Krystal, M. 1995. Growth impairment resulting from expression of influenza virus M2 protein in *Saccharomyces cerevisiae*: Identification of a novel inhibitor of influenza virus. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2204-2209.

- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Lamb, R.A., Lai, C.-J. et Choppin, P.W. 1981. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: collinear and interrupted mRNAs code for overlappind proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 4170-4174.
- Lamb, R.A. et Choppin, P.W. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. Ann. Rev. Biochem. **52**: 467-506.
- Lamb, R.A., Zebedee, S.L. et Richardson, C.D. 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. Cell 40: 627-633.
- Lamb, R.A. 1989. Gene and proteins of the influenza viruses. Dans Krug R.M., Fraenkel-Conrat, H. et Wagner, R.R. (eds.): The influenza viruses. New York: Plenum Press, pp1-88.
- Lamb, R.A. et Krug R.M. Orthomy xoviridae: The viruses and their replication. Dans Fields, B.N. et Knipe, D.M. (eds.): Fields Virology, 3<sup>e</sup> édition. Philadelphie: Lippincott-Raven Publishers, pp 1353-1396.
- Laver, W.G. et Valentine, R.C. 1969. Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. Virology 38: 105-119.
- Laver, W.G., Air, G.M., Webster, R.G., Gerhard, W., Ward, C.W. et Dopheide, T.A. 1981. The mechanism of antigenic drift in influenza virus: sequence changes in the haemagglutinin of variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. 288: 313-326.
- Lazarowitz, S.G. et Choppin, P.W. 1975. Enhancement of the infectivity of influenza A and B viruses by proteolytic cleavage of the hemagglutinin polypeptide. Virology **68:** 440-454.
- Lerner, R.A. 1983. Synthetic vaccines. Sci. Am. 248(2): 66-74.
- Levi, R., Aboud-Pirak, A., Leclerc, C., Lowell, G.H. et Arnon, R. 1995. Intranasal immunization of mice against influenza with synthetic peptides anchored to proteosomes. Vaccine 13(14): 1353-1359.
- Lin, B.C. et Lai, C.J. 1983. The influenza virus nucleoprotein synthesized from cloned DNA in a simian virus 40 vector is detected in the nucleus. J. Virol. 45: 434-438.
- Lin, Y.P., Shu, L.L., Wright, S., Bean, W.J., Sharp, G.B., Shortridge, K.F. et Webster, R.G. 1994. Analysis of the influenza virus gene pool of avian species from southern China. Virology 198: 557-566.

- Liu, M.A. 1998. Vaccine developments. Nature Med. 4(5): 515-519.
- Lubeck, M.D. et Gerhard, W. 1981. Topological mapping of antigenic sites on the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies. Virology 113: 64-72.
- Luoh, S.M., McGregor, M.W. et Hinshaw, V.S. 1992. Haemagglutinin mutations related to antigenic variation in H1 swine influenza viruses. J. Virol. 66: 1066-1073.
- Magar, R., Larochelle, R., Robinson, Y. et Dubuc, C. 1993. Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloïdal gold. Can. J. Vet. Res. 57: 300-304.
- Marsh, M. et Helenius, A. 1989. Virus entry into animal cells. Adv. Virus Res. 36: 107-151.
- Martin, K. et Helenius, A. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. Cell 67: 117-130.
- Maassab, H.F. et DeBorde, D.C. 1985. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines. Vaccine 3: 355-371.
- McCauley, J.W. et Mahy, B.J. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. Biochem. J. 211: 281-294.
- Montgomery, D.L., Shiver, J.W., Leander, K.R., Perry, H.C., Friendman, A., Martinez, D., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J. et Liu, M.A. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. DNA and Cell Biol. 12: 777-783.
- Morin, M., Phaneuf, J.B., Sauvageau, R., Difranco, F., Marsolais, G. et Boudreault, A. 1981. An epizootic of swine influenza in Quebec. Can. Vet. J. 22: 204-205.
- Morin, M., Girard, C., Elazhary, Y., Fajardo, R., Drolet, R. et Lagacé, A. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. Can. Vet. J. 31:837-839.
- Murphy, B.R. et Webster, R.G. 1990. Orthomy xovirus. Dans Fields, B.N. et Knipe, P.N. (eds.): Virology 2<sup>e</sup> édition. Raven Press, New York. pp1091-1152.
- Nasser, E.H., Judd, A.K., Sanchez, A., Anastasiou, D. et Bucher, D. 1996. Antiviral activity of influenza virus M1 zinc finger peptides. J. Virol. 70(12): 8639-8644.
- N'Diaye, M. 1995. Caractérisation d'un variant antigénique du virus influenza porcin de type A (H1N1) associé à la pneumonie proliférative et nécrosante. Mémoire de maîtrise, Institut Armand-Frappier, Université du Québec. 201 pages.

- Nestorowicz, A., Kawaoka, Y., Bean, W.J. et Webster, R.G. 1987. Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: Role of passerine birds in maintenance or transmission? Virology 160: 411-418.
- Neumeier, E. et Meier-Ewert, H. 1992. Nucleotide sequence analysis of the HA1 coding portion of the haemagglutinin gene of swine influenza viruses. Virus Res. 23: 107-117.
- Neumeier, E., Meier-Ewert, H. et Cox, N.J. 1994. Genetic relatedness between influenza A (H1N1) viruses isolated from humans and pigs. J. Gen. Virol. 75: 2103-2107.
- Noble, S., McGregor, M.S., Wentworth, D.E. et Hinshaw. V.S. 1993. Antigenic and genetic conservation of the haemagglutinin in H1N1 swine influenza viruses. J. Gen. Virol. 74: 1197-1200.
- Norman, J.A., Hobart, P., Manthorpe, M., Felgner, P. et Wheeler, C. 1997. Development of improved vectors for DNA-based immunization and other gene therapy applications. Vaccine 15(8): 553-555.
- Novagen. 1992. pET system manual. Novagen inc, 22 pages.
- Odagiri, T. et Tobita, K. 1990. Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenically causes aberrant replication and expression of the PA gene leads to generation of defective interfering particules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5988-5992.
- Olsen, C.W., McGregor, M.W., Cooley, A.J., Schantz, B., Hotze, B. et Hinshaw, V.S. 1993. Antigenic and genetic analysis of a recently isolated H1N1 swine influenza virus. Am. J. Vet. Res. 54: 1630-1636.
- Ottis, K. et Bachmann, P.A. 1980. Occurence of Hsw1N1 subtype influenza A viruses in wild ducks in Europe. Arch. Virol. 63: 185-190.
- Palese, P., Tobita, K., Ueda, M. et Compans, R.W. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology 61: 397-410.
- Palese, P., Zavala, F., Muster, T., Nussenzweig R.S., Garcia-Sastre, A. 1997. Development of novel influenza virus vaccines and vectors. J. Infect. Dis. 176(Supp 1): S45-49.
- Pardoll, D.M. et Beckerleg, A-M. 1995. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. Immunity 3: 165-169.
- Pennisi, E. 1997. First genes isolated from the deadly 1918 flu virus. Science 275: 1739.
- Qiu, Y. et Krug R.M. 1994. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNA containing poly(A). J. Virol. **68(4)**: 2425-2432.

- Ray mond, F.L., Caton, A.J., Cox, N.J., Kendal, A.P. et Brownlee, G. 1986. The antigenicity and evolution of influenza H1 hemagglutinin, from 1950-1957 and 1977-1983: two pathways from one gene. Virology 148: 275-287.
- Rawn, J.D. 1990. Traité de biochimie. Éditions du renouveau pédagogique Inc., Paris, France.
- Reay, P.A., Jones, I.M., Gotch, F.M., McMicheal, A.J. et Brownlee, G.G. 1989. Recognition of the PB1, neuraminidase, and matrix proteins of influenza virus A/NT/60/68 by cytotoxic T lymphocytes. Virology 170: 477-485.
- Rekik, M.R., Arora, D.J.S. et Dea, S. 1994. Genetic variation in swine influenza virus A isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. J. Clin. Microbiol. 32(2): 515-518.
- Richardson, J.C. et Akkina, R.K. 1992. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphory lated in infected cells. Arch. Virol. 116: 69-80.
- Roberts, J.D., Preston, B.D., Johnston, L.A., Soni, A., Loeb, L.A. et Kunkel, T.A. 1989. Fidelity of two retroviral reverse transcriptases during DNA-dependent DNA synthesis in vitro. Mol. Cell Biol. 9: 469-476.
- Robertson, J.S., Bootman, J.S., Newman, R., Oxford, J.S., Daniels, R.S., Webster, R.G. et Schild, G.C. 1987. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A (H1N1) virus. Virology 160: 31-37.
- Rocha, E., Cox, N.J., Black, R.A., Harmon, M.W., Harrison, C.J. et Kendal, A.P. 1991. Antigenic and genetic variation in influenza A (H1N1) virus isolates recovered from a persistently infected immonodeficient child. J.Virol. 65: 2340-2350.
- Rodgers, G.N., Paulson, J.C., Daniels, R.S., Skehel, J.J., Wilson, I.A. et Wiley, D.C. 1983. Single amino acid substitution in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. Nature 304: 76-78.
- Röhm, C., Zhou, N., Süss, J., Mackenzie, J. et Webster, R.R. 1996. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. Virology 217: 508-516.
- Rota, P.A., Rocha, E.P., Harmon, M.W., Hinshaw, V.S., Sheerar, M.G., Kawaoka, Y., Cox, N.J. et Smith, T.F. 1989. Laboratory characterization of a swine influenza virus isolated from a fatal case of human influenza. J. Clin. Microbiol. 27: 1413-1416.
- Rota, P.A., De, B.K., Shaw, M.W., Black, R.A., Gamble, W.C. et Kendal, A.P. 1990. Comparison of inactivated, live and recombinant DNA vaccines against influenza virus in a mouse model. Virus Res. 16: 83-93.

- Rott, R., Becht, H. et Orlich, M. 1974. The significance of influenza virus neuraminidase in immunity. J. Virol. 22: 35-41.
- Rudolph, R. et Lilie, H. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB 10: 49-56.
- Ruigrock, R.H.H., Calder, L.J. et Wharton, S.A. 1989. Electron microscopy of the influenza virus submembrane structure. Virology 173: 311-316.
- Ryan, K.W., Mackow, E.R., Channock, R.M. et Lai, C.J. 1986. Functional expression of influenza A viral nucleoprotein in cells transformed with cloned DNA. Virology 154: 144-154.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. et Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487-491.
- Schild, G.C. 1972. Evidence for a new type specific structural antigen of the influenza virus particle. J. Gen. Virol. 15: 99-103.
- Schultz, U., Fitch, W.M., Ludwig, S., Mandler, J. et Scholtissek, C. 1991. Evolution of pig influenza viruses. Virology 183: 61-73.
- Shapiro, G.I. et Krug, R.M. 1988. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. J. Virol. **62:** 2285-2290.
- Shaw, M.W., Arden, N.H. et Maassab, H.F. 1992. New aspects of influenza viruses. Clin. Microbiol. Rev. 5: 74-92.
- Sheerar, M.G., Easterday, B.C. et Hinshaw, V.S. 1989. Antigenic conservation of H1N1 swine influenza viruses. J. Gen. Virol. 70: 3297-3303.
- Shope, R.E. 1931. Swine influenza. III. Filtration experiments and etiology. J. Exp. Med. **54:** 373-380.
- Slemons, R.D. et Easterday, B.C. 1978. Virus replication in the digestive tract of ducks exposed to aerosol to type A influenza. Avian Dis. 22: 367-377.
- Slepushkin, V.A., Katz, J.M., Black, R.A., Gamble, W.C., Rota, P.A. et Cox, N.J. 1995. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. Vaccine 13(15): 1399-1402.

- Smeenk, C.A. et Brown, E.G. 1994. The influenza virus variant A/FM/1/47-MA possesses single amino acid replacement in the hemagglutinin, controlling virulence, and in the matrix protein, controlling virulence as well as growth. J. Virol. 68(1): 530-534.
- Smith, G.L. et Moss, B. 1983. Infectious opxvirus vectors have capacity for at least 25,000 base pairs of foreign DNA. Gene 25: 21-28.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. et Garten, W. 1992. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, asubtilisin-like endoprotease. J. Gen. Virol. 11: 2407-2414.
- Sugita, S., Yonemochi, H., Ogawa, T., Tanaka, Y. et Kumagai, T. 1980. Isolation of a recombinant influenza virus (Hsw1N2) from swine in Japan. Arch. Virol. 66: 271-274.
- Sugrue, R.J., Bahadur, G., Zambon, M.C., Hall-Smith, M., Douglas, A.R. et Hay, A.J. 1990. Specific structural alteration of the influenza haemagglutinin by amantadine. EMBO J. 9: 3469-3476.
- Sugrue, R.J. et Hay, A.J. 1991. Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. Virology **180**: 617-624.
- Suss, J., Schafer, J., Sinnecker, H. et Webster, R.G. 1994. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. Arch. Virol. 135: 101-114.
- Sweet, C. et Smith, H. 1980. Pathogenicity of influenza virus. Microbiol. Rev. 44(2): 303-330.
- Takeuchi, K. et Lamb, R.A. 1994. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. J. Virol. 68(2): 911-919.
- Taubenberger, J.K., Reid, A.H., Krafft, A.E., Bijwaard, K.E. et Fanning, T.G. 1997. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. Science **275**: 1793-1796.
- Thomson, G. et Carman, S. 1991. Proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) of swine: The Ontario situation. Can. Vet. J. 32: 313.
- Towbin, H., Staehelin, T. et 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.
- Treanor, J.J., Tiemey, E.L., Zebedee, S.L., Lamb, R.A. et Murphy, B.R. 1990. Passively transfered monoclonal antibodiy to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. J. Virol. 64(3): 1375-1377.

- Ulmanen, I., Broni, B.A. et Krug R.M. 1981. The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structure (m<sup>7</sup>GpppN<sub>m</sub>) on RNAs and in initiating RNA transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 7355-7359.
- Ulmer, , J.B., Donnelly, J.J., Parker, S.E., Rhodes, G.H., Felgner, P.L., Dwarki, V.J., Gromkowski, S.H., Deck, R.R., Dewitt, C.M., Friedman, A., Hawe, L.A., Leander, K.R., Martinez, D., Perry, H.C., Shiver, J.W., Montgomery, D.L. et Liu, M.A. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Nature 259: 1745-1749.
- Ulmer, J.B., Deck, R.R., Dewitt,, C.M., Friedman, A., Donnelly, J.J. et Liu, M.A. 1994. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. Vaccine 12: 1541-1544.
- Valcárcel, J., Fortes, P. et Ortín, J. 1993. Splicing of influenza virus matrix protein mRNA expressed from a simian virus 40 recombinant. J. Gen. Virol. 74: 1317-1326.
- Wakefield, L. et Brownlee, G.G. 1989. RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. Nucleic Acids Res. 17: 8569-8580.
- Watanabe, K., Handa, H., Mizumoto, K. et Nagata, K. 1996. Mechanism for inhibition of influenza virus RNA polymerase activity by matrix protein. J. Virol. 70: 241-247.
- Webster, R.G. et Hinshaw, V.S. 1977. Matrix protein from influenza A virus and its role in cross-protection in mice. Infec. Immun. 17(3): 561-566.
- Webster, R.G., Laver, W.G., Air, G.M. et Schild, G.C. 1982. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. Nature **296**: 115-121.
- Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M. et Kawaoka, Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. Microbiol. Rev. **56:** 152-179.
- Webster, R.G., Wright, S.M., Castrucci, M.R., Bean, W.J. et Kawaoka, Y. 1993. Influenza A model of an emerging virus disease. Intervirology 35: 16-25.
- Wentworth, D.E., McGregor, M.W., Macklin, M.D., Neumann, V. et Hinshaw, V.S. 1997. Transmission of swine influenza virus to humans after exposure to experimentally infected pigs. J. Infect. Dis. 175: 7-15.
- WHO collaborating centers for reference and research on influenza. 1982. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. U.S. Departement of Health and Human Services, Public Health Service Centers for Disease Control, Atlanta.
- Wiley, D.C., Wilson, I.A. et Skehel, J.J. 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their antigenic variation. Nature 289: 373-378.

- Wiley, D.C. et Skehel, J.J. 1987. The structure and fonction of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. Ann. Rev. Biochem. **56**: 365-394.
- Wilson, I.A. et Cox, N.J. 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. Ann. Rev. Immunol. 8: 737-771.
- Wood, J.M., Oxford, J.S., Dunleavy, U., Newman, R.W., Major, D. et Roberston, J.S. 1989. Influenza A (H1N1) vaccine efficacy in animal models in influenced by two amino acid substitutions in the hemagglutinin molecule. Virology 171: 214-221.
- Wolstenholme, A.J., Barrett, T., Nichol, S.T. et Mahy, W.J. 1980. Influenza virus-specific RNA and protein synthesis in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins. J. Virol. 35: 1-7.
- Yamashita, M., Krystal, M. et Palese, P. 1988. Evidence that the matrix protein of influenza C virus is coded for by a spliced mRNA. J. Virol. 62: 3348-3355.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. et Ishihama, A. 1993. Molecular assembly of influenza virus: Association of the NS2 protein with virion matrix. Virology 196: 249-255.
- Ye, Z., Pal, R., Fox, J.W. et Wagner, R.R. 1987. Functional and antigenic domains of the matrix (M1) protein of influenza A virus. J. Virol. 61(2): 239-246.
- Ye, Z., Baylor, N.W. et Wagner, R.R. 1989. Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides. J. Virol. 63(9): 3586-3594.
- Ye, Z., Robinson, D. et Wagner, R.R. 1995. Nucleus-targeting domain of the matrix protein (M1) of influenza virus. J. Virol. 69(3): 1964-1970.
- Yuanji, J. et Desselberger, U. 1984. Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. J. Gen. Virol. 65: 1857-1872.
- Zebedee, S.L., Richardson, C.D. et Lamb, R.A. 1985. Characterization of the influenza virus M2 integral membrane protein and expression at the infected-cell surface from cloned cDNA. J. Virol. **56:** 502-511.
- Zebedee, S.L. et Lamb, R.A. 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J. Virol. 62(8): 2762-2772.
- Zhang, J. et Lamb, R.A. 1996. Characterization of the membrane association of the influenza virus matrix protein in living cells. Virology **225**: 255-266.

Zuckerman, M. 1996. Influenza viruses and vaccines. Virus and Life 14: 11-13.

Zvonarjey, A.Y. et Ghendon, Y.Z. 1980. Influence of membrane (M) protein on influenza A virion transcription activity in vitro and its susceptibility to rimantadine. J. Virol. 33: 583-586.

ANNEXES

# Préparation des tampons et des solutions

#### 1.0 Tampon physiologique stérile, 10 mM PBS, pH 7,2-7,4

Le tampon 0,01 M PBS pH7,2-7,4 est préparé en dissolvant 8 g de NaCl (Baker Chemical Company); 0,2 g de KCl (Fisher); 1,15 g de Na<sub>2</sub>Hpo<sub>4</sub> (Baker) et 0,21 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fisher), dans 800 ml d'eau distillée (H<sub>2</sub>O). Le pH est ensuite ajusté à 7,2-7,4 avec une solution dibasique 0,1 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ou avec une solution monobasique 0,1 M de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Le volume est complété à 1 litre avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

#### 2.0 Solutions pour la purification des souches virales

A) NaN<sub>3</sub> 10% (p/v)

Dissoudre 10 g de NaN $_3$  dans 100 ml d'H $_2$ O distillée, filtrer sur membrane M illex GV de 0,22  $_{\mbox{\scriptsize LI}}$ g.

B) Solution de saccharose 50% (p/p) dans 10 mM de PBS pH7,2-7,4

Dissoudre 50 g de saccharose ultrapure (Canadian Scientific Products) dans 50 g de 10 mM PBS pH7,2-7,4, et ajouter 0,02% (v/v) de concentration finale de NaN<sub>3</sub>. Le principe est le même pour les solutions de 26% et de 22%.

# 3.0 Solutions pour le dosage protéique (BCA)

## A) Réactif A

Ajouter 10 g d'acide bicinchoninique (BCA; Pierce), 20 g de carbonate de sodium hy draté (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> . H<sub>2</sub>O; Baker), 1,84 g de tartrate de sodium (Fisher), 4 g d'hydroxy de de sodium (NaOH; Fisher) et 9,5 g de bicarbonate de sodium anhydre (NaHCO<sub>3</sub>; Fisher) dans 900 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Le pH est ajusté à 11,25 avec 5 M de NaOH et le volume est complété à 1 litre avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

# B) Solution de 4% (p/v) CuSO<sub>4</sub> . $5H_2O$

Dissoudre 1 g de sulfate de cuivre (BDH) dans 25 ml d'H2O distillée et filtrer sur membrane M illex GV 0,22  $\mu m$ 

#### C) Solution-stock BSA à 1 mg/ml

Dissoudre 10 mg d'albumine sérique bovine (BSA; RIA Grade, Sigma) dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O distillée et filtrer sur membrane Millex GV  $0.22 \,\mu$ m. Déterminer la concentration de la solution par absorbance à 280 nm en utilisant le coefficient d'extinction molaire du BSA pour une solution de 1% = 6.6667.

#### 4.0 Solutions pour SDS-PAGE

## A) Solution-stock de polyacry lamide 30% T, 2,67% C

Dissoudre 29,2 g d'acry lamide ultra-pure (Bio-Rad) et 0,8 g de N'N'-bis-methy lene-acrylamide (bisacry lamide; Bio-Rad) dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Filtrer la solution et conserver à la noirceur à 4°C.

## B) Solution-stock 10% (p/v) de SDS

Dissoudre 10 g de sodium dodecy l sulfate ultra-pure (SDS; Bio-Rad) dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45  $\mu$ m (Millipore, Bedford, USA).

## C) Tampon de séparation 1,5 M Tris-HCl pH8,8

Dissoudre 18,15 g de Tris base (Bio-Rad) et 0,02 g de NaN $_3$  dans 80 ml d'H $_2$ O distillée, ajuster le pH à 8,8 avec du HCl concentré (Baker) et compléter le volume à 100 ml avec de l'H $_2$ O distillée. Filtrer la solution sur membrane Milkex HA 0,45  $_{\mu}$ m (Millipore) et conserver à 4 $_{\circ}$ C.

# D) Tampon de tassement 0,5 M Tris-HCl pH6,8

Dissoudre 6,05 g de Tris base et 0,02 g de NaN3 dans 80 ml d'H2O distillée, ajuster le pH à 6,8 avec du HCl concentré (Baker) et compléter le volume à 100 ml avec de l'H2O distillée. Filtrer la solution sur membrane Millex HA 0,45  $\mu$ m (Millipore) et conserver à 4°C.

# E) Solution persulfate d'ammonium 10% (p/v)

Dissoudre 0,1 g de persulfate d'ammonium (Bio-Rad) dans 1 ml d' $H_2O$  distillée (préparer cette solution le jour même car elle est plus efficace lorsqu'elle est fraîche).

#### F) Préparation des gels de polyacry lamide de séparation 12% et de tassement 4%

	4%	12%
Solution-stock d'acylamide 30,0% (ml)	1,3	4
Tampon 1,5 M Tris-HCl pH8,8 (ml)		2,5
Tampon 0,5 M Tris-HCl pH6,8 (ml)	2,5	_
Solution 10% SDS (ml)	0,1	0,1
H <sub>2</sub> O distillée (ml)	5,99	3,29
TEMED (Bio-Rad) (ml)	0,01	0,01
Persulfate d'ammonium 10% (ml)	0,1	0,1
Volume cummulatif (ml)	10	10

#### G) Tampon dénaturant et réducteur 2X (Tampon échantillon)

Ajouter 4 ml de 10% (p/v) SDS; 2 ml de glycérol (Fisher); 0,5 ml de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Bio-Rad); 0,2 ml de bleu de bromophénol (Sigma) et 2,5 ml de tampon 0,5 M Tris-HCl pH6,8. Compléter le volume à 10 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée, filtrer sur membrane Millex 0,45  $\mu$ m et conserver à la température de la pièce. Si on veut le tampon sans agent réducteur, le  $\beta$ -mercaptoéthanol est remplacé par un volume équivalent d'H<sub>2</sub>O distillée.

## H) Tampon d'électrophorèse 0,1% SDS; 0,192 M gly cine et 0,025 M Tris pH 8,3

Dissoudre 3,03 g de Tris base, 14,41 g de gly cine (Bio-Rad) et 1 g de SDS ultra-pure dans 1 litre d'H<sub>2</sub>O distillée.

I) Solution 0,4% coomassie bleu brillant R250, 40% (v/v) méthanol et 10% (v/v) acide acétique glacial

Dissoudre 2 g de bleu de coomassie R250 (Bio-Rad) dans 200 ml de méthanol. Compléter le volume avec 250 ml d'H<sub>2</sub>O distillée et 50 ml d'acide acétique glacial (BDH).

## 5.0 Solutions pour le test d'ihibition de l'activité hémagglutinante (IHA).

# A) Solution d'Alsever pour la préparation des éry throcy tes de coq

Dans 900 ml d'H<sub>2</sub>O distillée, dissoudre 20,5 g de dextrose (BDH); 8,0 g de sodium citrate dihydraté (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> . 2H<sub>2</sub>O; Fisher); 4,2 g NaCl (BDH); 0,55 g d'acide citrique

(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; Fisher). Ajuster le pH à 6,1 avec 1 N de NaOH ou 1 N de HCl. Compléter le volume à 1 litre avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. Conserver à 4°C. Pour préparer les globules rouges de coq, centrifuger le tube contenant 10 ml de sang frais à 1000 r.p.m. pendant 10 minutes à 4°C. Remplacer le volume de sérum par un volume équivalent de solution d'Alsever froid et inverser délicatement le tube plusieurs fois pour resuspendre les globules rouges. Centrifuger à 1000 r.p.m. pendant 10 minutes à 4°C. Reprendre 2 fois le lavage, suite au troisième lavage décanter le surnageant et conserver le culot de globules rouges à 4°C.

#### B) Suspension des globules rouges de coq à 0,5% dans du PBS pH7,2-7,4

Suspendre 0,5 ml d'érythrocytes de coq citratés dans 99,5 ml de 10 mM de PBS pH7,2-7,4 froid. Conserver la suspension à 4°C jusqu'à utilisation.

#### 6.0 Solutions pour l'extraction d'ARNv

## A) Préparation de l'H<sub>2</sub>O distillée traitée au DEPC 0,1% (v/v)

Dans une hotte chimique, ajouter par litre  $d'H_2O$  distillée 1 ml de diéthylpyrocarbonate (Sigma). Incuber à 37°C pendant 2 heures ou 18 heures à la température de la pièce. Autoclaver 30 minutes à 15 lbs/po² afin d'éliminer les traces de DEPC pouvant modifier les résidus purines dans l'ARN par caboxy méthylation. Conserver à 4°C.

## B) Solution de sarkosyl 10% (p/v)

Dissoudre 5 g de sarkosyl (C<sub>15</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>NNa; Fisher Biotech) dans 45 ml d'H<sub>2</sub>O distillée traitée au DEPC (chauffer pour dissoudre) et compléter le volume è 50 ml. Conserver à la température de la pièce.

# C) Solution sodium citrate 0,75 M pH7,0

Dissoudre dans 40 ml d' $H_2O$  distillée traitée au DEPC 11,03 g de citrate de sodium (Fisher). Ajuster le pH à 7,0 avec 1 N de HCl et compléter le volume à 50 ml. Conserver à la température de la pièce.

D) Solution dénaturante (D): 4 M thiocyanate de guanidine; 0,5% (p/v) de sarkosyl; 0,1 M de  $\beta$ -mercaptoéthanol; 0,025 M de citrate de sodium pH 7,0

Dans un tube de 50 ml, dissoudre 23,63 g de guanidium thiocy anate dans 30 ml d'H<sub>2</sub>O distillée traitée au DEPC (chauffer dans un bain-marie pour dissoudre). Ajouter 1,6 ml de la solution 0,75 M de citrate de sodium (en C) et 2,5 ml de la solution 10% sarkosy l (voir en B). Agiter délicatement par inversion et compléter le volume à 50 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée traitée au DEPC. Cette solution se conserve au moins 3 mois à la température de la pièce. Pour l'extraction d'ARNv, ajouter 360  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol 14 M (Sigma) dans 50 ml de la solution dénaturante (D).

#### E) Solution de phénol : H2O saturé

Ajouter  $650\,\mu l$  d'H<sub>2</sub>O distillée traitée au DEPC à 5 ml de phénol : H<sub>2</sub>O (3,75 : 1 v/v) (GibcoBRL). Agiter par inversion jusqu'à ce que les phases disparaissent. Conserver à 4°C à la noirceur.

#### F) Solution de chloroforme: isoamyl alcool (24:1)

Ajouter 24 ml de chloroforme (Sigma) et 1 ml d'isoamy l alcool (Sigma) dans une bouteille et conserver à 4°C à la noirceur.

#### 7.0 Tampons et solutions pour l'électrophorèse sur gel d'agarose

#### A) Solution EDTA 0,5 M pH8,0

Dissoudre 37,22 g d'éthy lenediamine tetraacetic acid dihydraté (EDTA .  $2H_2O$ ; Sigma) dans  $150\,\text{ml}$  d' $H_2O$  distillée. Ajuster le pH à 8,0 avec  $1\,\text{N}$  de NaOH et compléter le volume à  $200\,\text{ml}$  avec de l' $H_2O$  distillée. Stériliser par filtration sur membrane de  $0,22\,\text{L}\text{m}$ .

#### B) Tampon TAE: 0,04 M Tris-acétate; 1 mM EDTA pH8,0

Dissoudre 4,84 g de Tris base dans 900 ml d' $H_2O$  distillée, ajouter 1,14 ml d'acide acétique glacial et 2 ml de 0,5 M EDTA pH8,0. Compléter le volume à 1 litre avec de l' $H_2O$  distillée. Stériliser par autoclavage 30 minutes à 15 lbs/po<sup>2</sup>.

C) Tampon échantillon 6X : 0,25% (p/v) bleu de bromophénol, 0,25% (p/v) xy lène-cy anol et 30% (v/v) gly cérol

Dissoudre 0,025 g de bleu de bromophénol (Sigma); 0,025 g de xy lène-cy anol (Sigma) dans 7 ml d' $H_2O$  distillée. Ajouter 3 ml de gly cérol (Fisher) et filtrer sur membrane de 0,45  $\mu$ m.

# D) Préparation d'un gel d'agarose 0,8% (p/v)

Dans un erlenmeyer de 200 ml, déposer 0,8 g d'agarose LE SeaKem (FMC BioProducts) et ajouter 100 ml de tampon TAE pH8,0. Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes ou sur une plaque chauffante. Faire couler l'agarose liquide dans un moule lorsque la température de la solution est environ à 60°C et laisser durcir à la température de la pièce sur un plateau à niveau.

# E) Solution de bromure d'éthidium 0,01 mg/ml

Ajouter 500  $\mu$ l d'une solution-stock de bromure d'éthidium 1,0 mg/ml dans 500 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Conserver la solution à la noirceur dans une hotte chimique.

# 8.0 Solutions pour la purification d'ADN plasmidique par la méthode "Boiling plasmid miniprep"

A) Solution STET: 8% (p/v) de saccharose; 5% (v/v) Triton X-100; 50 mM EDTA et 50 mM Tris-HCl pH8,0

Dissoudre 80 g de saccharose ultra-pure et 6,06 g Tris base dans 900 ml d' $H_2O$  distillée. Ajouter 50 ml de Triton X-100 (Sigma) et 100 ml de 0,5 M EDTA pH8,0. Ajuster le pH si nécessaire à 8,0 avec 1 N de HCl et compléter le volume à 1 litre avec de l' $H_2O$  distillée.

## B) Solution 75% (v/v) isopropanol; 2,5 M d'ammonium acétate

Préparer une solution d'acétate d'ammonium 10 M (CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>; Fisher) en dissolvant 77,08 g dans un volume final de 100 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée (chauffer à 37°C dans un bain-marie si nécessaire pour dissoudre complètement). Ajouter 25 ml de cette solution à 75 ml d'isopropanol (Signa). Conserver à la température de la pièce.

#### C) Solution de ly sozy me 10 mg/ml

Dissoudre 100 mg de ly sozy me (Worthington Biochemical Co.) dans 10 ml d' $H_2O$  distillée. Filtrer sur membrane de 0,22  $\mu$ m et distribuer dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. Conserver à -20°C.

## D) Solution d'ARNase 1 mg/ml

Dissoudre 10 mg de ribonucléase I "A" (Pharmacia Biotech inc) dans 10 ml d' $H_2O$  distillée. Filtrer sur membrane de 0,22  $\mu$ m et distribuer dans des tubes eppendorf de 1,5 ml. Conserver à -20°C.

# 9.0 Solutions utilisées pour la purification de l'ADN plasmidique à séquencer

A) Solution de resuspension (cell resuspension solution): 50 mM Tris-HCl à pH7,5; 10 mM EDTA et  $100 \, \mu g/ml$  de RNAse A, dans 50 ml d'H<sub>2</sub>O distillée.

Tris-HCl 50 mM: Dissoudre 0,3 g dans 30 ml d'H<sub>2</sub>O distillée et ajuster le pH à 7,5 avec du HCl.

EDTA 10 mM: Préparation au préalable d'une solution stock de 0,5 M à pH8,0 et prélever 1 ml de cette solution que l'on ajoute au Tris-HCl.

RNAse A: Peser 5 mg et ajouter au bécher contenant le Tris-HCl et le EDTA et compléter le volume à 50 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

B) Solution de ly se (cell ly sis solution): 0,2 M NaOH et 1% SDS dans 50 ml d'H<sub>2</sub>O distillée.

NaOH 0,2 M: Peser 0,4 g et ajouter dans 45 ml d'H2O distillée.

SDS 1%: Préparation au préalable d'une solution de 10% et prélever 5 ml de cette solution et ajouter au 45 ml contenant le NaOH.

C) Solution de neutralisation: 1,32 M d'acétate de potæssium à pH5,11

Peser 6,48 g d'acétate de potassium et ajouter dans 30 ml d' $H_2O$  distillée et ajuster le pH à 5,11 avec de l'acide acétique glacial. Compléter le volume à 50 ml avec de l' $H_2O$  distillée.

- D) Column Wash solution: Préparer les solutions ayant une concentration finale dans 120 ml de: 80 mM acétate de potassium, 8,3 mM Tris-HCl pH7,5, 40  $\mu$ M EDTA et 55% éthanol, mais préparer dans 50 ml.
- A) Acétate de potassium: 80 mM dans 120 ml mais 192 mM dans 50 ml Peser 0,942 g d'acétate de potassium
- B) Tris-HCl: 8,3 mM dans 120 ml mais 19,26 mM dans 50 ml
  Peser 0,12 g de Tris, ajouter à l'acétate de potæssium et ajuster le pH à 7,5 avec du
  HCl
- C) EDTA: 40  $\mu$ M dans 120 ml mais 96  $\mu$ M dans 50 ml Prélever 9,6  $\mu$ l d'une solution de 0,5 M et ajouter au Tris-HCl et à l'acétate de potassium. Compléter le volume à 50 ml.

Avant l'utilisation ajouter 70 ml d'éthanol 95%, ce qui représente 55% d'éthanol final dans 120 ml.

- 10.0 Solutions et milieux de culture pour le clonage et l'expression de la protéine recombinante
- A) Milieu 2xYT: 1,6% (p/v) tryptone; 1% (p/v) extrait de levure; 0,5% (p/v) de NaCl, pH7,0

Dissoudre 16 g de bactotry ptone (Difco), 10 g d'extrait de levure (Difco) et 5 g de NaCl dans 900 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Ajuster le pH à 7,0 avec 1 N de NaOH et compléter le volume à 1 litre avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. Stériliser par autoclavage 30 minutes à 15 lbs/po<sup>2</sup>.

B) Milieu solide 2XYT avec 1,5% (p/v) d'agar

Ajouter 0,75 g d'agar noble (Difco) dans une bouteille de 500 ml et ajouter 500 ml du milieu 2xYT en A. Stériliser par autoclavage 30 minutes à 15 lbs/po<sup>2</sup>.

C) Milieu SOC: 2% (p/v) tryptone; 0,5% (p/v) extrait de levure; 10 mM NaCl; 2,5 mM de KCl; 10 mM MgCl; et 20 mM de glucose, pH7,0

Dissoudre 16 g de bactotry ptone (Difco), 10 g d'extrait de levure (Difco) et 5 g de NaCl dans 950 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Préparer une solution de 250 mM de KCl en dissolvant 1,86 g de KCl (Fisher) dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée et ajouter 10 ml de cette solution dans le 950 ml de milieu ci-dessus. Ajuster le pH du mélange à 7,0 avec 1 N de NaOH et compléter le volume à 980 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée. Préparer une solution de 1 M de MgCh en dissolvant 20,3 g de MgCh. 6H<sub>2</sub>O (Baker) dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Stériliser les deux solutions à l'autoclave 30 minutes à 15 lbs/po<sup>2</sup>. Préparer une troisième solution-stock de 2 M de glucose en dissolvant 36 g de glucose (BDH) dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée et filtrer avec une membrane de 0,22 µm. Finalement, ajouter 10 ml des solutions stock 2 M glucose et 1 M MgCh au 980 ml de milieu préparé plus haut. Conserver à la température de la pièce.

#### D) Solution d'IPTG à 100 mM

Dissoudre 500 mg d'isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside (IPTG; GibcoBRL) dans 20 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Filtrer sur membrane de 0,22  $\mu$ m, aliquoter 500  $\mu$ l dans des tubes eppendorf de 1,5 ml et entreposer à -20°C.

#### E) Solution-stock d'ampicilline à 10 mg/ml

Dissoudre 100 mg d'ampicilline (Boehringer Manheim) dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Filtrer sur membrane de 0,22  $\mu$ m, aliquoter 500  $\mu$ l dans des tubes eppendorf de 1,5 ml et entreposer à -20°C.

## F) Solution-stock de carbeniciline à 10 mg/ml

Dissoudre 100 mg de carbeniciline (Calbiochem, Novabiochem) dans 10 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Filtrer sur membrane de 0,22  $\mu$ m, aliquoter 500  $\mu$ l dans des tubes eppendorf de 1,5 ml et entreposer à -20°C.

# G) Solution de 0,1 M de CaCh pour la transformation des cellules procary otes

Dissoudre 7,5 g de CaCk . 2H<sub>2</sub>O (Baker) dans 500 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Stériliser à l'autoclave 30 minutes à 15 lbs/po<sup>2</sup> et conserver à 4°C.

# H) Solution de PMSF à 100 mM

Dissoudre 400 mg de phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride (PMSF, Sigma) dans 20 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Filtrer sur membrane de 0,22  $\mu$ m, aliquoter 500  $\mu$ l dans des tubes eppendorf de 1,5 ml et entreposer à -20°C.

#### 11.0 Traitement appliqué pour solubiliser les corps d'inclusion de la bactérie

A) Tampon dénaturant et réducteur 2X (Tampon échantillon)

Ajouter 4 ml de 10% (p/v) SDS; 2 ml de glycérol (Fisher); 0,5 ml de β-mercaptoéthanol (Bio-Rad); 0,2 ml de bleu de bromophénol (Sigma) et 2,5 ml de tampon 0,5 M Tris-HCl pH6,8. Compléter le volume à 10 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée, filtrer sur membrane Millex 0,45 μm et conserver à la température de la pièce.

B) Préparation d'une solution-stock de 1 M de Tris-HCl pH7,5

Dissoudre 12,11 g de Tris base dans 90 ml d'H<sub>2</sub>O distillée et ajuster le pH à 7,5 avec 1 N de HCl. Compléter le volume à 100 ml avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

Pour le traitement ajouter au culot bactérien  $100\,\mu$ l du tampon échantillon 2X (en A) et  $10\,\mu$ l de la solution-stock de Tris-HCl pH7,5 (concentration finale de  $100\,\text{mM}$ ). Chauffer le tube contenant les solutions et le culot bactérien à  $50\,\text{c}$  pendant 30 minutes. Centrifuger à  $10\,000\,\text{x}$  g pendant 5 minutes et analyser chaque fraction sur un gel de polyacry lamide de 12%.

#### 12.0 Solutions pour la purification de la protéine recombinante

A) Tampon pour l'électroélution: 0,1% SDS; 0,192 M gly cine et 0,025 M Tris pH 8,3

Dissoudre 3,03 g de Tris base, 14,41 g de gly cine (Bio-Rad) et 1 g de SDS ultra-pure dans 1 litre d'H<sub>2</sub>O distillée.

B) Tampons pour la dialy se: 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 et 0,008 M Tris-HCl pH7,5

Pour le tampon: 0,05 M Tris-HCl pH 7,5

Dissoudre 24,22 g de Tris base dans 3,9 litres d'H<sub>2</sub>O distillée et ajuster le pH à 7,5 avec 10 N de HCl. Compléter le volume à 4 litres et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

Pour le tampon: 0,008 M Tris-HCl pH 7,5

Dissoudre 3,87 g de Tris base dans 3,9 litres d'H<sub>2</sub>O distillée et ajuster le pH à 7,5 avec 10 N de HCl. Compléter le volume à 4 litres et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.

C) Traitement de la membrane à dialy se

Couper la membrane à dialy se (Spectra/Por 12 kDa-14 kDa) à la longueur désirée et faire bouillir 5 minutes dans 100 ml d'H<sub>2</sub>O distillée contenant 100  $\mu$ l de 0,5 M EDTA à pH 8,0.

#### 13.0 Tampons et solutions pour le transfert électrophorétique et l'immunobuvardage

A) Tampon de transfert 20% (v/v) méthanol; 0,192 M glycine; 0,025 M Tris pH 8,3 et 0,02% (p/v) NaN<sub>3</sub>

Dans 1,6 litres d'H<sub>2</sub>O distillée, dissoudre 28,82 g de gly cine, 6,06 g Tris base, 0,4 g de NaN<sub>3</sub> et ajouter 400 ml de méthanol 100%. Conserver à 4°C.

B) Tampon TBS 10X: 20 mM Tris; 500 mM NaCl, pH 7,5

Dissoudre 2,42 g de Tris base et 29,24 g de NaCl dans 900 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Ajuster le pH à 7,5 avec 5 N de HCl et compléter à 1 litre avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

C) Solution-stock de Tween-20 10% (v/v) dans du TBS 1X, pH 7,5

Solubiliser 10 ml de Tween-20 dans 90 ml de tampon TBS 1X pH 7,5. Filtrer la solution sur membrane 0,45 <sub>LI</sub>m et conserver à la température de la pièce.

D) Solution de lavage 0,05% (v/v) Tween-20; TBS 1X pH 7,5

Ajouter 10 ml de la solution-stock 10% de Tween-20 dans 1,990 litres de tampon TBS 1X pH 7,5. On peut conserver la solution à 4°C pendant 1 semaine.

E) Solution de blocage 2% (p/v) BSA; 0,2% (v/v) Tween-20; TBS 1X pH 7,5

Dissoudre 2 g de BSA dans 98 ml de tampon TBS 1X pH 7,5. Ajouter 2 ml de la solution-stock 10% de Tween-20 et filtrer sur membrane de 0,45 µm. Conserver à 4°C.

F) Solution de dilution pour les anticorps et les conjugués à la peroxy dase : 1% (p/v) BSA; 0.1% (p/v) de Tween-20; TBS 1X pH7.5

Dans un bécher de 100 ml, ajouter 50 ml de tampon TBS 1X pH 7,5 à 50 ml de la solution de blocage (en E).

G) Solution de révélation : 0,06% (p/v) 4-chloro-1-naphthol (4CN); 0,015% (v/v) de peroxy de d'hydrogène; 20% (v/v) de méthanol et 80% (v/v) de tampon TBS 1X pH 7,5

Dissoudre 60 mg de 4CN (Bio-Rad) dans 20 ml de méthanol 100%, entreposer à -20 °C et protéger la solution contre la lumière. Immédiatement avant l'utilisation de la solution, ajouter 50  $\mu$ l de  $\rm H_2O_2$  30% et 80 ml de tampon TBS1X pH 7,5 à la température de la pièce. Utiliser immédiatement, ce mélange ne se conserve pas. Stopper la réaction en plaçant la membrane dans de l' $\rm H_2O$  distillée.

# 14.0 Solutions pour test ÉLISA indirect

A) Tampon 0,05 M NaCO<sub>3</sub> . H<sub>2</sub>O, pH 9,6

Dissoudre 1,59 g de carbonate de sodiumhy draté (NaCO3 .  $H_2O$ ; Baker); 2,93 g de bicarbonate de sodium anhydre (NaHCO3; Fisher) et 0,2 g de NaN3 dans 900 ml d' $H_2O$  distillée. Ajuster le pH à 9,6 avec une solution de 0,1 M de Na2CO3 ou avec 0,1 M de NaHCO3. Le volume est complété à 1 litre avec de l' $H_2O$  distillée et la solution est conservée à  $4 \circ C$ .

B) Solution-stock de Tween-20 10% (v/v) dans 10 mM PBS pH7,2-7,4

Solubiliser 10 ml de Tween-20 (Bio-Rad) dans 90 ml de tampon 10 mM PBS pH 7,2-7,4, et conserver à la température de la pièce.

C) Solution de lavage 0,05% (v/v) Tween-20 dans 10 mM PBS pH7,2-7,4

Ajouter 10 ml de la solution-stock 10% Tween-20 dans 1,99 litres de tampon 10 mM PBS pH7,2-7,4. On peut conserver la solution à 4°C jusqu'à une semaine.

D) Solution de blocage 2% (p/v) BSA; 0,1% (p/v) Tween-20 et 10 mM PBS pH7,2-7,4

Dissoudre 2 g de BSA dans 99 ml de tampon 10 mM PBS pH 7,2-7,4. Ajouter 1 ml de la solution-stock 10% Tween-20.

E) Solution de dilution pour les anticorps et les conjugués à la peroxy dase 1% (p/v) BSA; 0,05% (p/v) Tween-20 et 10 mM PBS pH7,2-7,4

Ajouter 50 ml de tampon 10 mM PBSpH7,2-7,4 à 50 ml d'une solution de blocage (voir en D).

F) Solution de révélation 0,4% (p/v) OPD; 0,012% (v/v)  $H_2O_2$  et 0,05 M acide citrique-0,1M  $Na_2HPO_4$ , pH 5,0

Le tampon citraté se prépare en dissolvant 10 g d'acide citrique (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>; Fisher); 14 g de phosphate de sodium dibasique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; Baker) dans 900 ml d'H<sub>2</sub>O distillée. Le pH est ajusté à 5,0 avec 1 N de HCl et le volume est complété à 1 litre avec de l'H<sub>2</sub>O distillée.

Pour la solution de révélation: 0,04 g d'hypochlorure d'orthophény lène diamine (OPD; Sigma) est dissout dans 100 ml de tampon citraté à pH 5,0. Un volume de 40  $\mu$ l d'une solution de peroxy de d'hydrogène à 30% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Fisher) est ajouté juste avant l'utilisation. La solution est conservée à la noirceur et à la température de la pièce avant l'addition du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 1. Méthode de quantification d'ARN viral par densité optique

Si 1 unité de densité optique à 260 nm (DO<sub>260</sub>) équivaut à 40  $\mu$ g d'ARN par ml, alors à partir d'une dilution d'ARN génomique 1 : 200 on aura:

ARN 
$$(\mu g/\mu l) = (DO_{260} \times 40 \times 200) / 1000 = DO_{260} \times 8$$

40: transforme la DO obtenue en  $\mu g/ml$ 

200: correspond au facteur de dilution

1000 : permet de transformer les ml en  $\mu l$ 

#### 2. Méthode de quantification d'ADN plasmidique par densité optique

Si 1 unité de densité optique à 260 nm (DO<sub>260</sub>) équivaut à 50  $\mu$ g d'ADN par ml, alors à partir d'une dilution d'ADN plasmidique 1 : 200 on aura:

ADN 
$$(\mu g/\mu l) = (DO_{260} \times 50 \times 200) / 1000 = DO_{260} \times 10$$

50: transforme la DO obtenue en  $\mu g/ml$ 

200 : correspond au facteur de dilution

1000: permet de transformer les ml en  $\mu l$ 

# 3. Détermination du facteur de purification de la préparation d'ARN ou d'ADN

On évalue le facteur de purification d'une préparation d'acides nucléiques par le rapport des densités optiques observées à 260 nm et à 280 nm comme suit:

Facteur de purification :  $(DO_{260} / DO_{280})$ 

Normalement on doit obtenir un facteur d'environ 2, plus la valeur du facteur de purification se rapproche de 1, plus notre préparation contient de protéines contaminantes qui ont un maximum d'absorption à 280mm.

## 4. Détermination du taux de mutation des protéines M1 et M2

Le taux de mutation représente le nombre de changements en acide aminé observé par résidu par année.

Prenons comme exemple la protéine M2:

Si on observe 5 changements en aa pour une souche comparativement à une autre, le taux de mutation se calcule de la façon suivante:

$$\left(\begin{array}{cc} \underline{5} & = & \underline{X} \\ 97 & 100 \end{array}\right)$$
 / # d'années qui sépare les souches

5 : # de changements observé

97: # d'aa au total que contient la protéine M2

100 : facteur de conversion (aa) puisque les deux protéines (M1 et M2) ne possèdent pas le même nombre d'aa

X: # de changements observé pour 100aa

Pour avor le résultat en pourcentage (%) de variation il ne reste qu'à multiplier le chiffre obtenu par 100

Annexe 3

Liste d'abréviations des acides aminés (aa)

Acides aminés  Alanine	Abréviations	
	Ala	A
Cystéine	Cys	C
Acide aspartique	Asp	D
Acide glutamique	Glu	E
Phénylalanine	Phe	$\mathbf{F}$
Glycine	Gly	$\mathbf{G}$
Histidine	His	н
Isoleucine	Пе	I
Lysine	Lys	K
Leucine	Leu	L
Méthionine	Met	M
Asparagine	Asn	N
Proline	Pro	P
Glutamine	Gln	Q
Arginine	Arg	R
Serine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Valine	Val	V
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y

Une partie de cette étude a été présentée à :

1. **M. Welman et D.J.S. Arora.** 1998. Genomic analysis of the matrix protein gene of swine influenza viruses (H1N1) associated with respiratory disease in pigs. American Society for Virology, 17<sup>th</sup> annual meeting. University of British Columbia, July 11-15.

Utilisation d'images digitalisées.

Toutes les figures, représentant les gels de polyacry lamide et les profils d'immunobuvardage, proviennent d'images digitalisées ou de photographies de ces gels. Pour la consultation des originaux, vous pouvez vous adresser à M. J. Arora, professeur à l'Institut Armand-Frappier, Université du Québec.