

MIGUEL RETAMAL

**ÉTUDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LA
NEURAMINIDASE DU VIRUS INFLUENZA PORCIN**

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

Jury d'évaluation :

Arora D.J.S., Ph. D.

Cellier M., Ph. D.

Lagacée J., Ph D.

Juin 1999

INRS

Institut Armand-Frappier

Université du Québec

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	ii
Liste des figures.....	v
Liste des Tableaux.....	vi
Liste des abréviations.....	vii
Sommaire.....	x
1. Introduction.....	1
2. Revue bibliographique.....	4
2.1 Le virus de la grippe.....	4
2.2 Nomenclature.....	4
2.3 Description et structure du virus.....	4
2.3.1 Le génome viral (ARN-).....	5
2.3.2 Les protéines associées au génome (NP, PA, PB1 et PB2).....	5
2.3.3 Les protéines de la matrice (M1 et M2).....	7
2.3.4 Les protéines non-structurales (NS1 et NS2).....	7
2.3.5 Les protéines de surface (HA et NA).....	8
2.3.5.1 L'hémagglutinine.....	8
2.3.5.2 La neuraminidase.....	9
2.3.5.2.1 Site actif.....	11
2.3.5.2.2 Sites antigéniques et antigénicité.....	12
2.3.5.2.3 Sites de glycosylation.....	12
2.4 Variants antigéniques.....	12
3. Méthodologie.....	14
3.1 Principaux tests utilisés.....	14
3.1.1 Test de l'hémagglutination.....	14
3.1.2 Test d'inhibition de l'hémagglutination.....	14
3.1.3 Test ELISA.....	15
3.1.4 Test de la neuraminidase.....	15
3.1.5 Test d'inhibition de la neuraminidase.....	16
3.2 Préparation des anticorps monoclonaux inhibiteurs de l'activité NA.....	17
3.2.1 Production et purification virale.....	17
3.2.2 Purification de la neuraminidase.....	18
3.2.3 Dosage protéique.....	19
3.2.4 Immunisation de souris.....	19

3.2.5 Fusion cellulaire.....	20
3.2.6 Criblages des hybridomes sécréteurs d'AcMo.....	22
3.2.7 Étalement et clonage des hybridomes d'intérêt.....	22
3.2.8 Production de fluide d'ascite.....	22
3.3 Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	23
3.3.1 Idiotypie.....	23
3.3.2 Purification des anticorps.....	24
3.3.3 Marquage des anticorps.....	25
3.3.4 Tests de compétition par radioimmunoessai.....	26
3.4 Analyses moléculaires suite à l'action d'AcMo anti-NA SwQc91.....	27
3.4.1 Sélection de virus variants.....	27
3.4.2 Clonage des virus variants en œufs.....	27
3.4.3 Clonage des virus variants en cellules MDCK.....	28
3.4.4 Traitements au DEPC.....	28
3.4.5 Extraction de l'ARN viral.....	29
3.4.6 RT-PCR sur le gène de la NA.....	30
3.4.7 Clonage du gène de la NA.....	30
3.4.8 Transformations de cellules inv α F'.....	31
3.4.9 Purification de l'ADN par la méthode d'ébullition.....	32
3.4.10 Digestions par enzymes de restrictions.....	32
3.4.11 Purification d'ADN par la méthode Wizard TM Plus.....	33
3.4.12 Séquençage du gène de la NA.....	34
4 Résultats.....	35
4.1 Préparation de l'antigène viral.....	35
4.1.1 Purification du virus influenza.....	35
4.1.2 Purification de la sous-unité antigénique de NA.....	35
4.2 Production d'hybridomes.....	38
4.2.1 Immunisation des souris.....	38
4.2.2 Criblage des hybridomes.....	38
4.3 Caractérisation des anticorps monoclonaux.....	42
4.3.1 Réactivité des anticorps monoclonaux.....	42
4.3.2 Isotypie des AcMo.....	42
4.3.3 Compétition en RIA.....	46
4.4 Création de variants antigéniques.....	46
4.4.1 Inhibition des infections par les AcMo.....	46
4.4.2 Titres INA après clonages en œufs.....	46

4.4.3 Titres INA après clonages en cellules MDCK.....	51
4.5 Identification des épitopes spécifiques au sein du gène de NA.....	51
4.5.1 RT-PCR sur les gènes de NA.....	51
4.5.2 Digestion des plasmides recombinants.....	51
4.5.3 Mutations non-spécifiques.....	56
4.5.4 Mutations spécifiques aux AcMo.....	56
5 Discussion.....	66
6 Conclusion.....	77
Remerciements.....	80
Bibliographie.....	81
Annexes.....	92
Annexe 1 : Préparation des solutions.....	92
Annexe 2 : Carte de restriction du plasmide recombinant PCR2.1™.....	98
Annexe 3 : Communications en date du dépôt de ce mémoire.....	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schéma du virus influenza.....	6
Figure 2	Schéma de la molécule de neuraminidase.....	10
Figure 3	Test INA sur le sérum de souris à terme pour une fusion cellulaire.....	39
Figure 4	Isotype des anticorps monoclonaux anti-neuraminidase.....	45
Figure 5	Courbes de compétitions entre les anticorps monoclonaux anti- NASwQc91.....	47
Figure 6	RT-PCR sur les gènes de NAV653, NAV2H5 et NAV2D4.....	52
Figure 7	Digestion de plasmides recombinants PCR2.1/NAV2H5 avec les enzymes de restrictions EcoRI, BamHI et Pst I.....	54
Figure 8	Séquences nucléotidiques des gènes de neuraminidase des virus variants et parentaux.....	57
Figure 9	Résumé des variations dues aux sélections par anticorps monoclonaux.....	64
Figure 10	Topographie des sites de fixation des anticorps monoclonaux anti-NA.....	69
Figure 11	Structure du monomère de NA localisant les épitopes associés aux AcMo 2D4 et 2H5.....	76

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I :	Purification de virus influenza porcin.....	36
TABLEAU II :	Purification de la neuraminidase du virus influenza porcin SwQc91 par chromatographie d'affinité.....	37
TABLEAU III :	Criblage d'hybridomes sécréteurs d'AcMo anti-NA SwQc91.	40
TABLEAU IV :	Réactions en tests ELISA et INA des fluides d'ascites de trois anticorps monoclonaux anti-NASwQc91.....	43
TABLEAU V :	Préparation in-ovo de variants antigéniques de virus influenza porcin (A/Sw/Qc/5393/91).....	47

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AA	Acide aminé
Å	Angström
A ₂₅₀	Absorbance à une longueur d'onde de 250 nm
A ₂₅₄	Absorbance à une longueur d'onde de 254 nm
A ₂₆₀	Absorbance à une longueur d'onde de 260 nm
A ₂₈₀	Absorbance à une longueur d'onde de 280 nm
A ₄₉₀	Absorbance à une longueur d'onde de 490 nm
A ₅₆₂	Absorbance à une longueur d'onde de 562 nm
AcMo	Anticorps monoclonaux
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique codant
Ag	Antigène
ARN	Acide ribonucléique
ARNv	Acide ribonucléique viral
BSA	Albumine sérique bovine (« Bovine Serum Albumin »)
cm	Centimètre
CPM	Coups par minute
Ci	Curie
DEAE	Diéthyle-aminoéthyle
DEPC	Diéthylpyrocarbonate
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DO	Densité optique
DTT	Dithiotréitol
ELISA	Essai immunosorbant lié enzymatiquement (« Enzyme linked immunosorbent assay »)
h	Heures
HA	Hémagglutinine
HAT	Hypoxanthine-aminoptérine-thymidine
HEPES	N-2 Hydroxyéthylpiperazine N'-2-Ethane sulfonic acid
HT	Hypoxanthine-Thymidine
Ig	Immunoglobuline
IHA	Inhibition de l'hémagglutination
INA	Inhibition de la neuraminidase
ip	Intra-péritonéal

iv	Intra-veineux
kg	Kilogrammes
Kpb	Kilo paires de bases
L	Litre
LA	Liquide allantoïque
M	Molaire
mM	Millimolaire
mg	Milligramme
min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètres
μ Ci	Microcurie
μ g	Microgramme
μ L	Microlitre
μ m	Micromètre
N	Normale
nts	Nucléotides
NA	Neuraminidase
NASwQc91	Neuraminidase du virus SwQc91
NASwQc81	Neuraminidase du virus SwQc81
NAPOA	Acide N-(p-aminophényle) oxamique
ng	Nanogramme
nm	Nanomètre
NP	Nucléoprotéines
NP-40	Nonidet P-40 ou (octylphénoxy)-polyéthoxyéthanol
OPD	Ortho-phénylène-diamine-benzène
pb	Paires de bases
PBS	Tampon phosphate salin (« phosphate buffer saline »)
pmol	Picomole
PM	Poids moléculaire
PPN	Pneumonie proliférative et nécrosante
p/p	Poids/poids
p/v	Poids/volume
sec	Seconde
SFV	Sérum foetal de veau
SDS	Dodécylsulfate de sodium (« Sodium dodecyl sulfate »)

SwQc81	A/Sw/Qc/192/81
SwQc91	A/SwQc/5393/91
SwKlop	A/Sw/Qc/3291/90
RNP	Ribonucléoprotéines
RIA	Radioimmunoessai
TBS	Tampon tris salin (« tris buffer saline »)
TNC	Trop nombreuses pour être comptées
TP	Température de la pièce
U	Unité enzymatique internationale
UFP	Unité formant des plages
UHA	Unités hémagglutinantes
UV	Ultra-violets
VIP	Virus Influenza porcin
v/v	Volume/volume
°C	Degrés Celsius

SOMMAIRE

Nous avons développé des anticorps monoclonaux pour le dépistage du virus influenza porcin Québécois sur une base neuraminidasique et nous les avons caractérisé. Ces anticorps non seulement nous indiquent l'étendue de l'évolution antigénique du virus au sein du cheptel porcin, mais leur utilisation dans la création de variants nous offre des renseignements sur la nature des mutations sur le terrain. Trois AcMo NA-spécifiques ont été étudiés ; 2H5, 3A3 et 2D4. 2H5 était spécifique de souche pour A/Sw/Qc/5393/91 (SwQc91), et 2D4 non spécifique de souche. Ces anticorps caractérisés de façon intrinsèque en tant que molécules et extrinsèques en tant que réactifs, nous ont permis de pousser notre étude jusqu'à l'identification des épitopes au niveau génique. En effet, sur le gène NA des virus variants V2H5 et V2D4 sélectionnés avec les AcMo 2H5 et 2D4, une seule mutation aux positions d'acides aminés 273 et 386 respectivement, a été détectée comme étant associée à l'activité des anticorps. Toutefois certaines mutations ponctuelles (19 et 392) ne sont pas dues à une quelconque pression immune humorale et pourraient être dues à une pression sélective sur la NA par les cellules hôtes. Finalement, la quantité plutôt restreinte d'AcMo spécifiques obtenus pour la souche SwQc91, est indice d'une faible évolution antigénique de la NA entre deux épidémies de gripes porcines locales ayant mis en cause les virus A/Sw/Qc192/81 (SwQc81) et SwQc91 respectivement.

1 INTRODUCTION

La grippe humaine et porcine attribuées au virus influenza de type A H1N1 est apparue simultanément chez les humains et les porcs en 1918 (Raymond et al, 1986 ; Xu et al, 1993). Deux lignées virales porcines principales sont présentement en circulation à travers le monde (Hinshaw et al., 1984). En Angleterre et dans le reste de l'Europe, le cheptel porcin est souvent affligé par un virus antigéniquement très proche des virus aviaires (Hinshaw et al., 1984; Scholtissek et al., 1983). Des souches typiques représentatives américaines et européennes souvent utilisées pour fins comparatives sont respectivement A/swine/Wisconsin/1/67 et A/swine/Belg/1/79 (Brown et al., 1993).

Certaines études montrant que le profil immunitaire antigrippal des éleveurs de porcs était significativement plus développé que chez le reste de la population humaine, tendaient à démontrer que des échanges réciproques de virus influenza entre les porcs et les éleveurs seraient chose courante (Aymard et al, 1980). D'autre part des travaux ont démontré la possibilité d'émergence de nouvelles souches suite à une recombinaison entre souches animales et humaines (Kaplan, 1980). Le virus influenza porcin peut ainsi se retrouver chez l'être humain et causer des infections pouvant être fatales, comme c'est occasionnellement le cas chez certains éleveurs de porcs (Wentworth et al., 1994; Claas et al., 1994 ; Rota et al., 1989).

En 1981 des épidémies très symptomatiques affligeaient les porcs du Québec. Les porcs avaient de la fièvre, jusqu'à 41,5°C, de l'anorexie, un affaissement, des écoulements nasal et oculaire, ainsi qu'une toux d'intensité variable. Toutefois la guérison était rapide avec un taux de mortalité minime. Un virus antigéniquement semblable aux autres souches nord-américaines a été isolé à partir des tissus pulmonaires. Celui-ci a été nommé A/Sw/Québec/192/81 (SwQc81) (Morin et al., 1981).

En 1988 des épidémies sporadiques au Québec affectaient sévèrement au niveau des poumons les porcelets en bas âge. Ceux-ci accusaient un retard pondéral, étaient affectés d'une pneumonie proliférative avec bronchiolite et bronchite nécrosante. On observait une hyperprolifération des pneumocytes de type II, avec épithélialisation de la paroi alvéolaire. De plus, le système immunitaire des porcs était affaibli par l'infection et laissait place à la prolifération des micro-organismes opportunistes tels *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis* et *Pneumocystis carinii*. Le virus le plus retrouvé au sein des tissus pulmonaires était un

variant antigénique influenza de type A non-reconnu par les sérums disponibles. Ce virus a été isolé et nommé A/Sw/Quebec/5393/91 (SwQc91), (Morin et al., 1990; Dea et al., 1992).

La production porcine du Québec compte pour 31 % de la production canadienne. Au Canada les recettes de l'industrie porcine s'élèvent à 2 milliards de dollars, générant approximativement 100 000 emplois. Le tiers de la production nationale est exporté dans environ 55 pays. Le Conseil canadien du porc a proposé un dépistage systématique du virus influenza, non seulement afin de garder un contrôle sur les épidémies dues à ce virus, qui semble intrinsèque chez le porc, mais aussi pour des fins d'exportations avisées (Conseil canadien du porc, 1996). C'est pourquoi des outils de diagnostic tels des AcMo utilisés en trousse de dépistage de type ELISA se devaient d'être créés. Au cours des travaux de recherche de N'Diaye (1995), un AcMo spécifique dirigé contre la sous-unité HA1 de l'hémagglutinine (HA) de SwQc91 a été produit et caractérisé. Cet AcMo anti-HA appelé G9, constituait un premier outil de dépistage spécifique du virus SwQc91. Cet AcMo a montré que deux groupes antigéniquement distincts de virus porcins circulent au Québec. De plus, les séquences nucléotidiques de HA1 ont permis l'établissement d'un arbre phylogénique basé sur l'HA (Arora et al., 1997a). Ces travaux cumulés avec ceux de Rezik et al (1994), montrant que plus d'un gène distinguait SwQc91 de SwQc81, nous ont poussés à étudier des protéines autres que l'HA afin de bien cerner la totalité de l'évolution du virus entre les deux vagues d'épidémies de grippe porcine au Québec.

Bien qu'il existe des outils pour dépister le virus influenza tels les sérums hyperimmuns, monospécifiques, les AcMo dirigés contre des protéines plutôt conservées telles les nucléoprotéines (NP) (Schild et Pereira, 1969; Schild, 1972), ou voire même non-conservées tels les HA, aucun moyen de dépister le virus de façon spécifique et précise par rapport à la neuraminidase (NA) n'existait avant les travaux décrits dans ce mémoire. Pourtant une étude sur la NA, la deuxième protéine majeure de surface, montre qu'elle a un taux de mutation de $2,28 \times 10^{-3}$ par site nucléotidique par année, avec 42% des mutations résultant en des substitutions d'acides aminés (Xu et al., 1996). Cela ajouté à la possibilité d'une cassure antigénique, font qu'il devient nécessaire de suivre le virus en dépistant l'HA et la NA en parallèle.

La séquence nucléotidique de la NA SwQc91 ayant été complétée dans notre laboratoire a par la suite permis une analyse phylogénique basé sur la NA. Cet arbre phylogénique a montré que la NA SwQc91 est très semblable, mais distincte de la NA de l'autre souche québécoise SwQc81 et de la souche nord-américaine de référence:

A/Sw/Wisconsin/4754/94. Il y avait à partir de la séquence déduite d' AA, 23 différences entre les deux souches québécoises (Arora et al., 1997b). Toutefois les mutations alors répertoriées ne se trouvaient pas au sein des sites antigéniques jusqu'ici publiés dans la littérature pour la NA de type N1 (Concannon et al., 1984).

La technique de sélection de variants échappant aux anticorps a été effectuée pour la première fois par Gerhard et Webster (1978). Cette technique a permis de créer in-vitro des variants subissant une pression antigénique semblable à celle subie in-vivo sur le terrain. Cela a permis de mieux étudier le phénomène de glissement antigénique. Les variants antigéniques ont d'abord été constatés. Plus tard avec l'avènement de la biologie moléculaire, des virus variants par rapport à l'HA ont été séquencés (Laver et al., 1981 ; Luoh et al., 1992). L'utilité des variants antigéniques s'est surtout faite sentir pour l'élucidation des sites antigéniques et catalytiques de la neuraminidase N2 du virus A/Tokyo/3/67 (Colman, 1983). Les variants restent toutefois d'un intérêt marqué pour l'étude des épitopes de tout nouvel AcMo fabriqué et permettent aussi d'étudier et comparer le pouvoir sélectif et/ou inhibiteur de ces anticorps.

Donc, dans l'intention d'améliorer le dépistage du virus SwQc91 par rapport à la NA, et d'améliorer nos connaissances à propos de l'évolution antigénique de la NA, nous avons fixé deux objectifs dans la présente recherche: 1) Créer des AcMo dirigés contre la NA du virus A/Sw/Qc/5393/91, les caractériser en tant que molécules et quant à leurs interactions stériques. 2) Étudier l'effet de ces AcMo sur le virus et plus particulièrement sur le gène NA, en créant des variants et en associant des variations à des épitopes.

2 REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 LE VIRUS DE LA GRIPPE

Le virus influenza est d'abord l'agent causal de la grippe. Celle-ci est une maladie virale hautement contagieuse, évoluant par grandes pandémies espacées sévères et par épidémies locales et annuelles. Le début d'une grippe est brutal, avec fièvre de 39 à 40°C, anorexie, frissons, courbatures, céphalées et des complications propres à chaque espèce ou individu (Nouveau Larousse Médical, 1988). L'aspect très virulent, pathogène, voire mortel de ce virus a été mis en cause aussitôt qu'en 430 avant Jésus-Christ, au cours du fléau d'Athènes (Langmuir et al., 1985). Le virus de la grippe a causé au cours des dernières décennies, d'importantes épidémies et pandémies, dont la grippe espagnole en 1918 ayant fait 20 millions de victimes, la grippe asiatique en 1957 et la grippe de Hong-Kong en 1968. L'Organisation Mondiale de la Santé a depuis longtemps établi des centres internationaux de surveillance de l'influenza situés à Atlanta aux États-Unis et à Londres en Angleterre (Brès, 1980). De plus, elle recense environ 600 publications annuelles consacrées à ce virus (Hannoun, 1980).

2.2 NOMENCLATURE

Le virus influenza est du genre *influenzavirus* de la famille des *orthomyxoviridae*. Il y a trois types sérologiques; A, B et C, classés selon l'antigénicité de leurs nucléoprotéines (Fields, 1990). Les plus souvent retrouvés chez le porc sont les types A H1N1 et H3N2. Rappelons que H et N indiquent l'HA et la NA en question. Il existe à ce jour dans la littérature 15 HA antigéniquement différentes, et 9 NA (Webster et al., 1992; Schild et al., 1980, Fields, 1997). Le virus utilisé dans la présente recherche est identifié ainsi: A/Sw/Qc/5393/91 (H1N1). Cette appellation indique qu'il s'agit d'un virus de type A se retrouvant chez le porc (Sw pour swine), au Québec, prélèvement 5393 et isolé au cours de l'année 1991. Finalement, ce virus possède les antigènes (Ag) de surface de sous-types H1 et N1. Ce système officiel de classification est régi par les centres internationaux de surveillance de l'influenza.

2.3 DESCRIPTION ET STRUCTURE DU VIRUS

Le virus influenza est très pléomorphe et de taille moyenne par rapport aux autres virus. La forme sphérique de diamètre moyen de 100 nm est la plus courante (Elphord et al., 1943). Toutefois, le virus prend souvent une forme de filament d'environ 1 µm de longueur

(Choppin et al., 1961). Le poids d'un virus est évalué entre 280 et 360 mégadaltons. Tel que l'on peut voir à la figure 1, les deux protéines majeures de surface du virus sont l'HA et la NA. Deux protéines de matrice (M1 et M2), dont M1 serait sous-jacente à l'enveloppe biphospholipidique, et M2 un pompe à proton transmembranaire. À l'intérieur se trouve une structure hélicoïdale appelée ribonucléoprotéines (RNP) composée de protéines de capsides enrobant des segments d'ARN génomiques viraux de polarité négative. À l'intérieur se retrouvent également les protéines basiques PB1 et PB2, ainsi que la protéine acide PA. Les protéines non-structurales NS1 et NS2 complètent le virus en y apportant le pouvoir de transcription inverse nécessaire au début de chaque infection (Fields, 1990).

2.3.1 *Le génome viral (ARN-)*

Des trois types sérologiques existants, A et B possèdent un génome de 8 segments d'acides ribonucléiques viraux (ARNv) codant pour 10 protéines virales au cours du cycle d'infection. Le type C possède quant à lui 7 segments et code pour 9 protéines virales (Ada et Perry, 1954; Hirst, 1973). Cet ARNv est de polarité négative, c'est-à-dire qu'il doit être d'abord transcrit positivement avant de pouvoir fournir un gabarit positif pour la synthèse protéique. L'ARNv est monocaténaire et représente 0,8 à 1,1 % de la masse virale (Frish-Niggemayer et Hoyle, 1956; Frommhagen et al., 1959). Chaque segment code pour une protéine virale et ces segments sont identifiés de 1 à 8 selon l'ordre de migration en gel de polyacrylamide de la protéine la plus lourde à la plus légère (Fields, 1990). Chez le type A chacun des deux plus petits segments d'ARN génomique (7 et 8) code pour deux polypeptides.

2.3.2 *Les protéines associées au génome (NP, PB1, PB2 et PA)*

Les protéines les plus intimement liées à l'ARNv sont les nucléoprotéines (NP). Cette protéine a un poids moléculaire (PM) de 60 000 et est constituée de 498 à 565 acides aminés (AA) (Murphy et Webster, 1990). C'est la NP qui sert à identifier antigéniquement les types viraux A, B et C. Elle représente environ 25 % des protéines totales. Cette protéine protège et stabilise l'acide nucléique et sa présence semble requise à la transcription d'ARNv (Ritchey et Palese, 1977). Ce sont des protéines karyophiles qui sont dirigées vers le noyau cellulaire, où elles s'aggrègent autour de l'ARN (Davey et al., 1985).

Il y a trois protéines associées de façon non-covalentes qui forment un complexe avec l'ARNv (Krystal et al., 1986). Il s'agit des protéines basiques PB1, PB2 et de la protéine

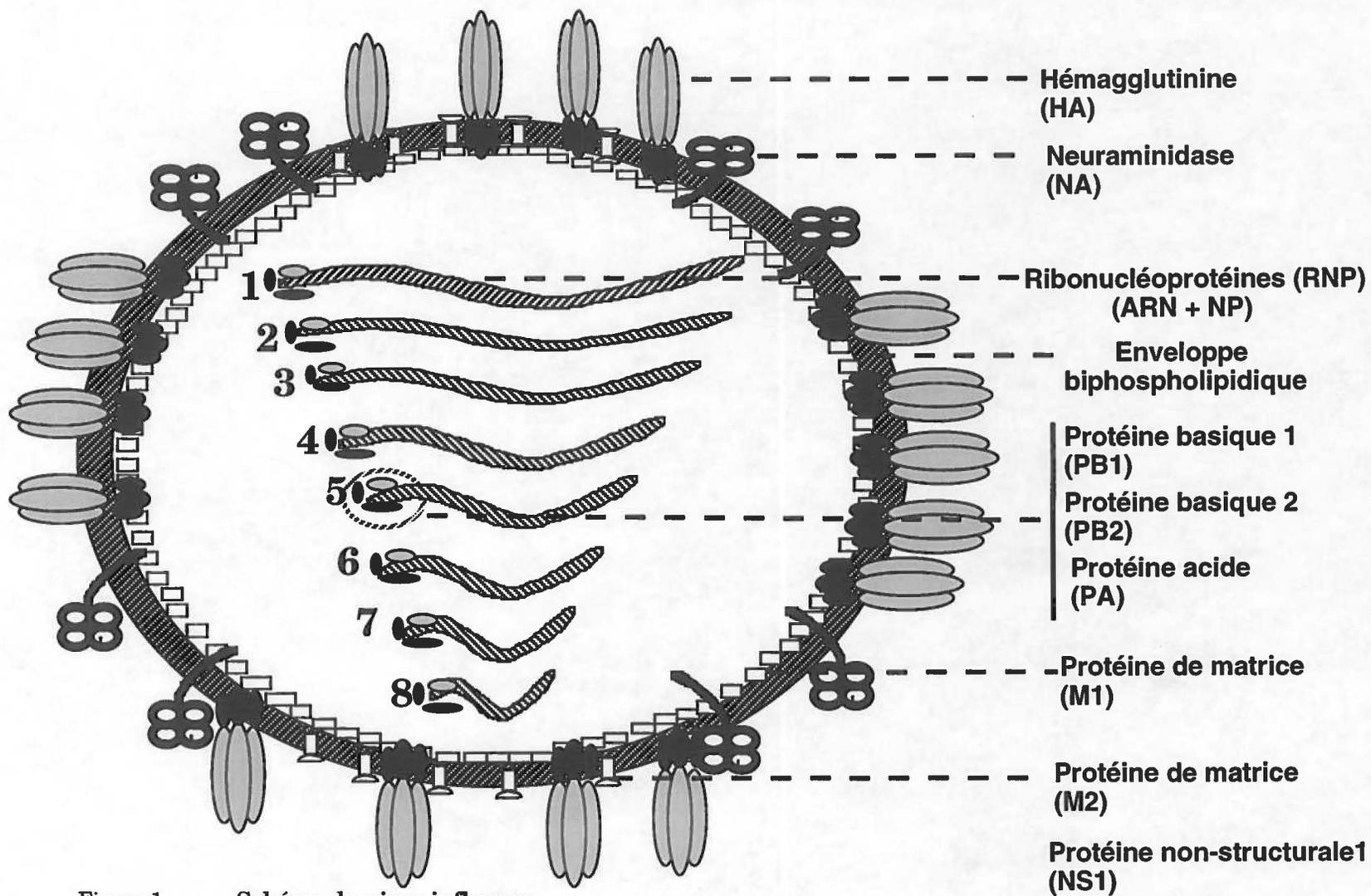


Figure 1 Schéma du virus influenza

À gauche la représentation des différentes composantes d'un virus influenza de type A tel que décrit dans la littérature (Fields,1996). À droite, le nom des différentes composantes virales. NS1 et NS2 étant par définition des protéines non-structurales sont mentionnées sans schématisation. Le numéros de 1 à 8 représentent les segments génomiques codant respectivement pour les protéines suivantes: PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M1 et M2, NS1 et NS2.

acide PA. La protéine PB2 semble montrer une affinité pour les nucléotides coiffés et serait impliquée dans la reconnaissance de la coiffe. PB1 lie le premier guanoside ajouté après la coiffe et semblerait contenir le site actif pour l'élongation de l'ARN (Ulmanen et al., 1981, 1983). Le rôle de la protéine acide PA associée à ce complexe n'est pas encore trouvé, toutefois PA se retrouve complexé à PB1 et PB2 lors de l'élongation de l'ARN (Braam et al., 1983). Les protéines PB1, PB2 et PA sont codées par les segments d'ARNv 1, 2 et 3 respectivement.

2.3.3 *Les protéines de la matrice (M1 et M2)*

Bien que M1 et M2 soient codées par le même segment d'ARNv (le 7^e du génome), M1 est une protéine structurale alors que M2 est non-structurale (Murphy et al., 1990). Les deux protéines ne sont pas codées par le même cadre de lecture. M1 est une protéine de 252 AA intimement associée à l'enveloppe biphospholipidique, mais offrant aussi un bon contact avec les RNP (Joassin et al., 1987). M2 est une protéine membranaire intégrale de 97 AA qui est exprimée à la surface des cellules infectées et qui par le fait se retrouve donc intégrée à la membrane virale suite au bourgeonnement des virions. La protéine M1 compose 33 à 46 % des protéines totales. Des travaux récents montrent que M2 aurait une activité de pompe à ions, mais serait absente chez les souches de type B (Hay et al, 1985 ; Pinto et al., 1992). Le segment d'ARN codant pour M1 et M2 est long de 1 027 nucléotides. Il y a environ 3 000 M1 par particule virale et de 20 à 60 M2 par particule virale. Mentionnons également que les ARNm issus du segment 7 résultent souvent en un épissage différentiel donnant naissance à un petit ARNm ayant un potentiel codant de 9 AA identique à l'extrémité COOH de la protéine M1. Cette dernière protéine est appelée M3 (Lamb et al., 1981 ; Valcarcel et al, 1993)

2.3.4 *Les protéines non-structurales (NS1 et NS2)*

Il y a aussi les protéines dites non-structurales, c'est-à-dire qu'elles n'entrent pas dans la composition de la structure du virus. Ces protéines ne sont donc nécessaires qu'à l'accomplissement du cycle de multiplication virale, par conséquent elles ne se retrouvent que dans les cellules infectées par le virus (Lamb et al., 1978 ; Inglis et al., 1979; Lamb et Choppin, 1979). NS1 a un PM de 23 000 et est synthétisée en phase précoce (Skehel, 1973), elle migre ensuite aux nucléoles (Lazarowitz et al., 1971 ; Krug et Etkin, 1973 ; Krug et

Soeiro, 1973). Dans la phase tardive du cycle viral, NS1 s'accumule dans le cytoplasme pour former des corps d'inclusion (Morongiello et Dales, 1977 ; Shaw et Compans, 1978). Le PM de NS2 est de 11 000, est synthétisé en phase tardive et demeure dans le cytoplasme (Lamb et al., 1978; Mahy et al., 1980). Les deux protéines sont issues du même 8^e segment d'ARN viral (le plus petit). L'épissage différentiel de l'ARN messager est responsable de la synthèse de deux protéines différentes, voire NS1 et NS2. NS1 est composé de 237 AA, tandis que NS2 est composé de 132 AA (Fields, 1990 ; Lamb et Choppin, 1983). Comme ces protéines s'accumulent dans le noyau cellulaire de la cellule infectée, on croit qu'elles ont un rôle dans la transcription spécifique d'ARN viral.

2.3.5 Les protéines de surface (HA et NA)

2.3.5.1 L'hémagglutinine

L'HA est la protéine majeure de surface du virus influenza. Cette protéine représente 25 % des protéines totales (Murti et al., 1986). Il s'agit d'une protéine subissant des glycosylations, ce qui en fait une glycoprotéine. Le 4^e plus gros segment d'ARNv code pour une protéine qui se scinde et résulte en deux sous-unités protéiques, HA1 et HA2 de PM respectifs de 36 000 et 27 000. Ces deux sous-unités sont liées seulement par un lien disulfure. La structure quaternaire de cette protéine est trimérique (Murphy et Webster, 1990). Les trimères sont uniformément répartis en surface du virion. Il s'agit d'une protéine hautement antigénique qui possède un taux élevé de mutations. La sous-unité HA2 est transmembranaire et de type I, c'est-à-dire avec l'extrémité amino-terminale extra-cytoplasmique. La sous-unité HA1 est celle arborant les sites antigéniques spécifiques (S) et communs (C). Ce sont les variations nucleotidiques à ces sites qui sont responsables du glissement antigénique. Le spicule HA est responsable de l'adsorption du virus aux récepteurs cellulaires d'acides sialiques ou acide N-acétyl-neuraminique. L'HA est donc responsable du début de l'infection virale (Inglis et al., 1976), (McGeoch et al., 1976). Chaque monomère sur le trimère possède un site actif, ce qui lui confère la capacité d'agglutiner des globules rouges.

La portion HA1 du gène de l'HA du virus SwQc91 a évolué avec deux substitutions d'acides aminés aux sites antigéniques Sb et Ca, et une autre mutation lui faisant perdre un site de glycosylation par rapport à HA1SwQc81. L'évolution du gène HA1 s'est donc limitée au glissement antigénique entre les deux épidémies mettant en cause ces deux virus locaux (Rekik et al, 1993).

2.3.5.2 *La neuraminidase*

La NA est faite de quatre monomères ayant chacun un PM de 60 000 (Itztein et al, 1993). Le tétramère a un PM de 240 000 et est glycosylé à divers sites selon le type de NA (Ward, 1982). Le monomère de NA est codé par le 6^e segment d'ARN du génome viral. La neuraminidase représente de 5 à 10 % de la masse protéique virale totale, et représente 10 à 20 % des projections de surface (Bucher et Palese, 1975; Mc Cauley et Mahy, 1983). En microscopie électronique la NA a la forme d'un champignon en surface de l'enveloppe virale. La tête de ce champignon mesure 100 Å x 100 Å x 60 Å et est hissée sur une tige d'un diamètre de 15 Å ayant une longueur d'environ 100 Å, (Colman et Ward, 1985).

La protéine NA est du type II à la surface membranaire virale, c'est-à-dire que son extrémité amino-terminale est à l'intérieur du virus. Tel que décrit en figure 2, la protéine forme un tétramère ayant trois régions distinctes: la tête globulaire contenant le site actif et la plupart des sites antigéniques (AA 74 à 470), le manche contenant une portion hydrophobe transmembranaire (AA 7 à 73), et la partie cytoplasmique (AA 1 à 6) (Air et Laver, 1989; Fields, 1990). Le monomère de NA ne possède pas d'activité enzymatique, celle-ci n'est apparente que pour la conformation tétramérique. Des études utilisant des anticorps monoclonaux (AcMo) spécifiques de conformations ont permis de montrer que la tétramérisation ainsi que sa glycosylation par des glycosyl-transférases cellulaires, se font dans le réticulum endoplasmique (Saito et al, 1995). La chaîne polypeptidique de NA est repliée en six feuilletts β -antiparallèles topologiquement identiques formant une structure en hélices (Varghese et al., 1983). Bien que son activité enzymatique soit évidente, son utilité au cours du cycle d'infection reste encore hypothétique. Il a été proposé que l'enzyme NA serve au relargage des virions nouvellement synthétisés à partir des cellules infectées (Palese et al, 1974; Liu et al, 1995). Certains ont proposé que la NA aide le virus à traverser les couches de mucus sur les parois des voies respiratoires (Burnet, 1948 ; Colman & Ward, 1985 ; Klenk & Rott, 1988). Finalement, certains ont également proposé que la NA joue son rôle à l'étape d'entrée du virus dans le cytoplasme par fusion cellulaire (Huang et al., 1980).

Il a déjà été démontré que la NA comme l'HA, est capable de stimuler la réponse immune non-spécifique, médiée par les cellules cytotoxiques telles les cellules NK (Arora et al, 1984; Arora et Houde, 1991). De plus, la NA stimulerait la cytotoxicité cellulaire par un mécanisme indépendant de l'interféron (Arora et Justewicz, 1986, 1988). Certains sous-types de NA, telles N2 et N9, possèdent comme l'HA, une activité hémagglutinante (Arora et

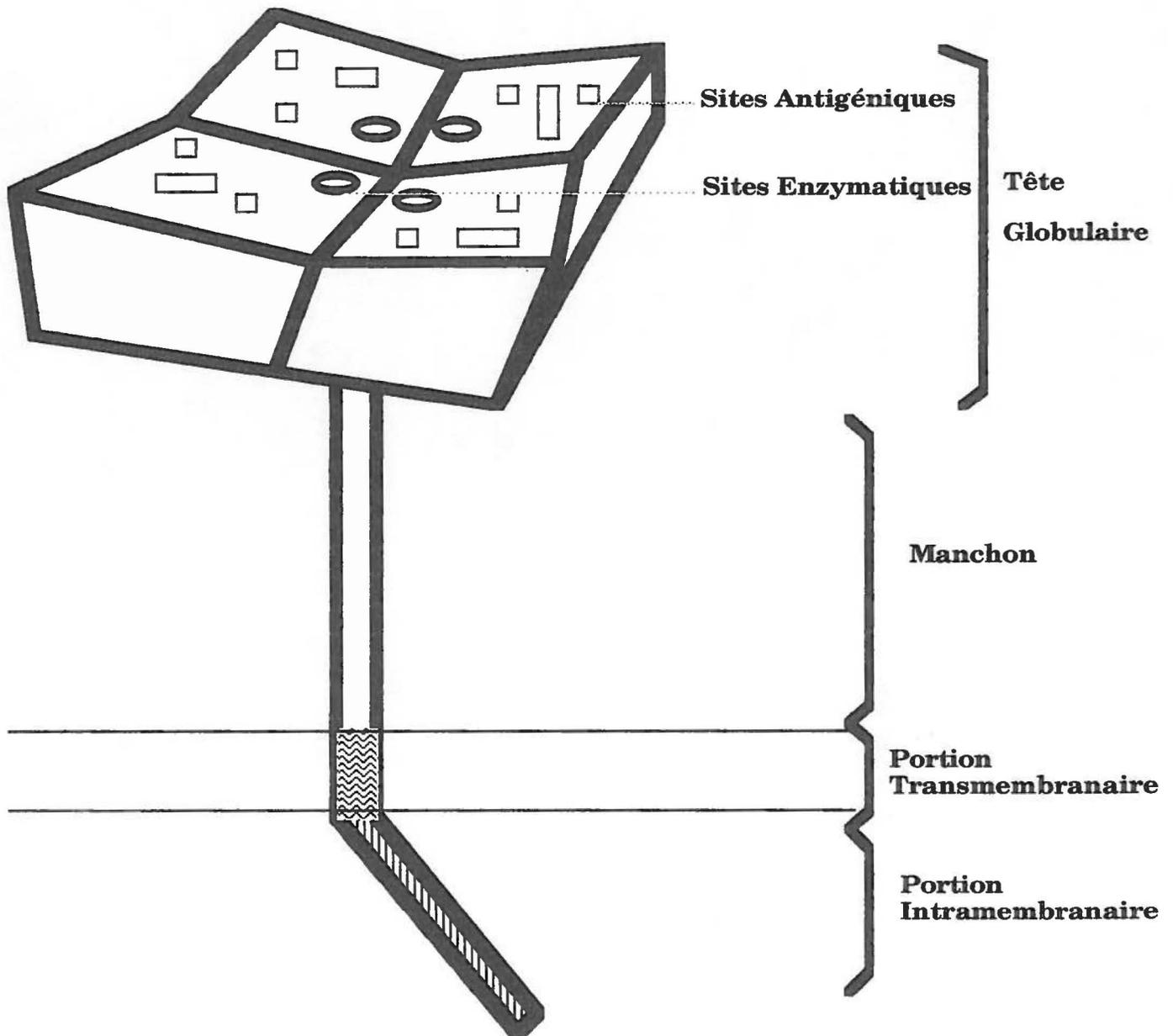


Figure 2 Schéma de la molécule de neuraminidase

La molécule de neuraminidase comporte quatre principales parties: la portion intramembranaire (AA 1 à 6), transmembranaire (AA 7 à 35), le manchon (AA 36 à 73), et la tête globulaire (AA 74 à 470) contenant les sites actifs et les sites antigéniques. (Fields et al., 1990).

Gabriel, 1986). Un vaccin de NA purifiée plus stable et efficace que le vaccin inactivé complet tel qu'administré présentement a déjà été proposé (Arora, 1979).

La capacité d'inhibition de l'hémagglutination par les AcMo anti-NA sur certains virus ayant des N2, a démontré que la distribution des molécules de NA au travers des molécules HA en surface virale, pourrait varier selon les virus (Webster, 1982).

Les gènes de neuraminidase des virus SwQc81 et SwQc91 ont été séquencés par notre laboratoire et analysés. Les séquences déduites d'AA possédaient un niveau élevé d'identité (> 95 %). Le gène NA était de 1 459 nts codant pour 469 AA, possédant une extrémité 5' non-codante de 21 nts et une extrémité 3' non-codante de 28 nts. Parmi les différences en AA des parties codantes il y en avait respectivement 5, 6 et 12 au sein des portions hydrophobes du manchon et de la tête globulaire. Chez la NASwQc91 un potentiel déterminant antigénique en position 453 avait muté une alanine pour une thréonine, un site de glycosylation apparaissait en position d'AA 88, tandis qu'un autre disparaissait en position 50 lorsque comparé à NASwQc81 (Arora et al., 1997).

2.3.5.2.1 Site actif

La NA est une sialidase, c'est-à-dire une enzyme capable d'hydrolyser spécifiquement les liens alpha-cétosidiques entre les acides sialiques et les sucres adjacents (Corfield, 1992). Le site actif présent sur chaque monomère est responsable de cette activité sialidasique. Le site actif fixe son substrat, voire l'acide sialique, avec une constante d'affinité de 1mM. Les quatre sites actifs se trouvent à l'extrémité de la tête globulaire dans une poche catalytique cernée de dix AA acides (119, 151, 198, 227, 243, 276, 277, 293, 330, 425), cinq AA basiques (118, 152, 224, 274, 292), deux AA hydrophobes (134 et 178) et un AA hydrophile (179) (Colman et al, 1983). Ces AA sont conservés chez tous les virus A et B (Elleman et al., 1982). Le site actif se trouve au centre de la structure en hélice déjà décrite. Il peut être inhibé par des AcMo dirigés contre les sites antigéniques. Cette interaction provoque un encombrement stérique qui empêche le substrat de l'enzyme de se rendre au site catalytique. Un inhibiteur thérapeutique découvert récemment, le zanamivir, fait appel au blocage des sites actifs plutôt conservés dans les protéines de neuraminidase (Povinelli, 1998).

2.3.5.2.2 Sites antigéniques et antigénicité

Autant chez les variants antigéniques naturels isolés sur le terrain que chez les variants antigéniques créés in-vitro à l'aide d'anticorps monoclonaux, les mutations apparaissent toujours aux mêmes sites. Ces sites sont dit antigéniques. D'après Colman et ses collaborateurs, ces sites ne sont pas parfaitement distincts, mais semblent se chevaucher en formant un anneau autour du site actif (Colman et al, 1983). Chez le sous-type N1, les huit sites antigéniques sont identifiés aux résidus d'AA 153, 197-199, 328-336, 339-347, 367-370, 400-403, 402-411 et 431-434 (Concannon et al, 1984). Les AcMo contre la NA ne neutralisent pas l'infectivité du virus, à moins d'être en très hautes concentrations (Kilbourne et al, 1968). Il a été démontré que malgré le fait que la NA ne semble pas nécessaire à l'infection virale chez des cellules, les AcMo anti-NA modifient la maladie en amenuisant les titres viraux et les lésions pulmonaires (Schulman, 1975). Ces anticorps jouent donc un rôle dans l'épidémiologie de l'influenza.

2.3.5.2.3 Sites de glycosylation

Les variations antigéniques reflètent souvent les variations de glycosylations engendrées par une mutation. Parmi les sites de glycosylation les plus conservés pour la N1, il y a les séquences consensus Asn-X-Ser/Thr aux résidus d'AA suivants ; 44, 58, 88, 146, 235, 365, et 455 (Colman, 1989). Il existe toutefois beaucoup d'autres types de glycosylation O-liée et N-liée pouvant être faites par les nombreuses glycotransférases au sein de l'appareil de Golgi des cellules eucaryotes (Darnell et al, 1990).

2.4 VARIANTES ANTIGÉNIQUES

Les variants antigéniques de l'influenza ont été observés in-vitro pour la première fois suite au constat qu'en présence de sérum sous-neutralisant des virus réussissaient à se multiplier et étaient différents du virus parental (Archetti et al., 1950; Haaheim et al., 1976). L'avènement de la culture d'hybridomes sécrétant des AcMo a fourni un outil de grande valeur pour de nombreuses applications, entre autres pour l'étude des variants antigéniques (Köhler et Milstein, 1975). Gerhard et Webster ont, en 1978, créé pour la première fois des variants antigéniques du virus A/PR/8/34 H0N1 avec des AcMo dirigés contre l'HA. Les variants obtenus alors n'étaient identifiés que par leurs réactions antigéniques (IHA et RIA). En

1981, Laver et Air ont identifié les variations de glissement antigénique provoqué par les AcMo, comme étant dues à des variations aux positions 142 et 145 de la protéine HA1. Ils avaient utilisé pour cela, le virus Hong-Kong H3N2, des AcMo anti-HA1 et une méthode de digestion tryptique pour le séquençage peptidique. Ils ont aussi fait des variants multiples, c'est-à-dire mutés à divers AA suite à des passages avec différents AcMo anti-HA1 (Laver et Air, 1981). Un simple passage en présence d'anticorps monoclonaux in-vitro sélectionne des variants antigéniques montrant un seul AA de différence avec le virus parental, cela avec une fréquence de 10^{-5} (Webster et al, 1982). En 1982, Caton et collaborateurs ont utilisé la méthode de variants antigéniques afin de caractériser les sites antigéniques de l'HA du virus A/PR/8/34. Non seulement ils ont utilisé une carte opérationnelle des réactions en RIA, mais ils ont également séquençé les gènes mutants de l'HA de sous-type H1 en identifiant les mutations. En 1982, l'équipe de recherche de Webster s'est penchée de façon analogue sur la NA en créant pour la première fois des variants neuraminidasiques. Ces variants ont été identifiés antigéniquement par les tests d'IHA et d'INA et le virus utilisé était A/Japan/305/57 de type N2. Toujours sur la N2 du même virus, Colman et coll.(1983) ont caractérisé les sites antigéniques et enzymatiques décrits dans les paragraphes précédents, en identifiant les AA changés sur les virus variants. En 1984, le groupe de recherche de Natali est arrivé grâce à la technique des variants antigéniques à la conclusion que le sérum humain possédait un répertoire d'anticorps limité pour les sites antigéniques de la NA du virus influenza A/Texas/77 H3N2. En 1992, Luoh et collaborateurs ont travaillé avec le virus influenza porcine A/Sw/IN/1726/88 H1N1 et ont identifié sur le gène de l'HA les épitopes associés aux AcMo utilisés pour la sélection des variants. Ces chercheurs ont aussi observé que des variations à l'extérieur des sites antigéniques pouvaient affecter les sites antigéniques et qu'une distance phylogénique élevée entre deux virus ne reflétait pas automatiquement une distance topographique élevée au sein des sites antigéniques. Néanmoins, chaque test de criblage possède la capacité de sélectionner différents virus variants. Ainsi par le test INA seuls les variants ayant des variations près du site actif peuvent être identifiés. Il y a donc un certain biais de par le choix du test de criblage (Air et al, 1985).

3 MÉTHODOLOGIE

3.1 PRINCIPAUX TESTS UTILISÉS

3.1.1 Test de l'hémagglutination

Le test de l'hémagglutination sert principalement à détecter le virus et à le quantifier rapidement en exploitant sa propriété d'agglutiner les globules rouges. La méthode utilisée est celle proposée par les centres internationaux de surveillance de l'influenza (Centers for Disease Control (CDC), 1982). Pour effectuer ce test nous avons utilisé des plateaux de 96 puits à fond rond (Nalge Nunc International, Life Technologies, Grand-Island, N.Y, Canada). Nous avons mis 50 μ L de tampon phosphate (PBS, décrit en annexe 1) dans tous les puits, ainsi que 50 μ L des échantillons viraux à tester, en duplicata, dans la première rangée du plateau. Nous avons par la suite dilué sériellement d'un facteur 2 le contenu de la première rangée jusqu'à la dernière. Finalement, 50 μ L d'une solution de globules rouges de coq à 0,5 % ont été ajoutés. 30 à 45 minutes (min) plus tard, lorsque les puits témoins sans virus présentaient un bouton rouge au fond des puits, nous avons identifié le titre en unités hémagglutinantes (HA) de nos échantillons viraux comme étant la dilution sériée (de 2 à 4096 HA) la plus élevée présentant une hémagglutination.

3.1.2 Test de l'inhibition de l'hémagglutination

Pour effectuer le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA), nous avons distribué 25 μ L de PBS dans tous les puits d'un plateau de 96 puits à fond rond identiques à ceux utilisés en tests HA, toutefois nous n'avons rien mis dans la première rangée. Nous avons ajouté 50 μ L d'anticorps dans la première rangée et nous avons fait une dilution sériée d'un facteur deux en transférant 25 μ L de la première rangée jusqu'à la dernière. Nous avons ajouté partout l'antigène viral dilué à un titre de 8 HA dans une solution de PBS. Après une incubation à température de la pièce (TP) de 30 min, nous avons ajouté 50 μ L de globules rouges de coq 0,5 %, nous avons agité doucement, incubé 30 min à TP, et lu le titre IHA comme étant la dernière dilution sériée n'ayant pas subi une hémagglutination (CDC, 1982).

3.1.3 Test ELISA

Pour faire les tests d'essais d'immunoabsorbance liés enzymatiquement (ELISA), 50 μ L d'une suspension virale à 10 μ g/mL dans un tampon d'adsorption (voir annexe 1) ont été distribués dans tous les puits excepté la première rangée d'un plateau à fond plat pour ELISA (Linbro/Titertek, ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA). L'incubation a été faite à 4°C pendant 18 heures (h). Ensuite la saturation des puits s'est faite avec une solution de saturation (voir annexe 1) pendant 90 min à TP. 5 lavages ont été faits avec une solution de lavage (voir annexe 1). 50 μ L de sérum immun ou de surnageant de culture d'hybridomes ont été distribués dans les puits excepté dans la première rangée, et nous avons incubé 60 min à TP. Nous avons ensuite ajouté une dilution 1/5000 d'anticorps conjugués de chèvre anti-souris dirigés contre les chaînes lourdes d'immunoglobuline G de souris et couplés à l'enzyme peroxydase de raifort (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Afin de révéler la fixation des anticorps primaires à leur antigène, nous avons après cinq lavages, ajouté 50 μ L par puits de solution de révélation (voir annexe 1). La révélation s'est faite à l'obscurité 15 min à TP. Nous avons arrêté la réaction enzymatique en ajoutant 100 μ L de H₂SO₄ 2 N. Les lectures des absorbances ont été faites avec un lecteur ELISA (EAR 400 AT, SLT-Labinstruments, Salzburg, Autriche) à la longueur d'onde de 490 nm (A₄₉₀).

3.1.4 Test de la neuraminidase

Le test de la neuraminidase sert à mesurer colorimétriquement l'activité enzymatique de la NA. Il s'agit ici d'un test adapté de la méthode d' Aymard-Henry et al (1973) suivant le protocole officiel international du CDC (1982). Le virus purifié utilisé était dilué à 0,1 mg/mL dans du PBS à 0,15 % Triton X-100. Cette préparation a été agitée pendant 30 min à TP, avant de l'utiliser pour faire d'autres dilutions de 0,01 et 0,001 mg/mL. Dans des tubes de verre à bouchons pouvant contenir des volumes d'environ 10 mL, 50 μ L de chacune des trois dilutions virales, 50 μ L de tampon phosphate 0,5 M (voir annexe 1) pH6,0 et 50 μ L de substrat de fétuine (Sigma, St-Louis, MO, USA) à 50 mg/mL, ont été mélangés. Les mélanges virus/phosphate/fétuine ont été agités et incubés 18 h dans un bain à 34°C. Des tubes témoins sans virus ont également été mis en réaction, un double volume de tampon phosphate compensait pour le volume. Une fois l'incubation terminée, 250 μ L de solution de méta-périodate de sodium ont été mis dans chaque tube et bien agités, lesquels ont été incubés de nouveau dans le bain, cette fois-ci à 37°C. 300 μ L de solution d'arsenite de

sodium (voir annexe 1) ont été ajoutés, et les tubes agités jusqu'à disparition complète de la couleur brune. Nous avons ensuite mis 2 mL de solution d'acide thiobarbiturique que nous avons également agité. Après 8 min dans un bain bouillant, nous avons laissé refroidir les tubes à TP avant d'y ajouter 4 mL d'une solution de butanol à 0,6 N HCl et d'extraire vigoureusement au vortex les pigments chromophores. Les phases organiques et aqueuses se séparaient 30 min à TP. Nous avons ensuite centrifugé les tubes à 2000 g 10 min à TP. Nous avons transféré les phases organiques dans des tubes de verre plus petits afin de pouvoir lire les A_{549} , grâce au spectrophotomètre (Cary 1E, Varian, Australie). Une courbe de l' A_{549} en fonction de la quantité de virus utilisé nous a permis d'identifier la quantité de virus nécessaire pour avoir une A_{549} de 0,8. Cette quantité de virus est celle qui a été utilisée pour les tests d'inhibition de la neuraminidase (INA).

3.1.5 Test d'inhibition de la neuraminidase

Ce test est également celui utilisé par le CDC (1982), adapté de la méthode d'Aymard-Henry (1973). Pour effectuer ce test nous avons d'abord standardisé notre antigène viral pour obtenir une A_{549} de 0,8. 50 μ L de cet antigène viral standardisé ont été distribués dans des tubes de verre de 10 mL, auxquels nous avons ajouté 50 μ L d'anticorps soit de dilutions sériées de sérum ou de surnageant de culture d'hybridome. L'incubation a été faite pendant 1 h à TP et 50 μ L de fétuine à 50 mg/mL ont été ajoutés à chaque tube. Nous avons incubé 18 h à 34°C et révélé les réactions telles que décrites pour le test NA ad-hoc. Pour calculer les titres en % INA, nous avons utilisé l'équation suivante;

$$\% \text{ INA} = \left[1 - \frac{A_{549} \text{ (échantillon)} - A_{549} \text{ (témoin fétuine)}}{A_{549} \text{ (témoin positif)} - A_{549} \text{ (témoin fétuine)}} \right] \times 100$$

3.2 PRÉPARATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX INHIBITEURS DE L'ACTIVITÉ NA

3.2.1 Production et purification virale

Pour produire le virus nous avons utilisé une semence virale gardée à -80°C . Nous avons dilué cette semence à un titre viral de 2 HA avec du PBS stérile. Nous avons ensuite infecté stérilement des oeufs de poulets âgés de 11 jours avec 200 μL de dilution virale par voie chorioallantoïdienne. Nous les avons incubés à 33°C dans un environnement humide pendant 48 h et nous les avons transférés à 4°C jusqu'à la récolte. Le liquide allantoïque de chaque oeuf a été prélevé et gardé temporairement à 4°C dans un erlenmeyer contenant 0.02 % NaN_3 . La purification du virus a été effectuée selon la méthode mise au point dans notre laboratoire (Arora et al., 1985). Nous avons donc clarifié à 4°C le liquide allantoïque infectieux au travers de la laine minérale garnissant un entonnoir afin de nous départir des résidus grossiers. Des coussins de 1 mL de sucrose 50% (p/p) au fond de tubes d'ultracentrifugation de 30 mL (Beckmann Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) congelés à l'azote liquide ont été recouverts de 2 mL de sucrose 22% (p/p) afin de créer un gradient discontinu de sucrose. Après congélation à l'azote liquide de nouveau, une trentaine de millilitres de liquide allantoïque par tube a été distribué sur les gradients. Les tubes ont été ultracentrifugés à 90 000 g dans un rotor à angle fixe (50.2Ti, Beckmann) à 4°C pendant 60 min. Les coussins ont été réutilisés plusieurs fois en les recongelant et en versant de nouveau un autre volume de liquide allantoïque par dessus. Une couche de virus précipitant à 30% de sucrose (p/p) s'est donc retrouvée concentrée au sein du gradient discontinu. Le surnageant se trouvant au-dessus du gradient a été jeté et les coussins de sucrose infectieux gardés. Après avoir indiqué avec un marqueur l'endroit du culot (se trouvant sur la paroi du tube), les culots sont dissous avec le sucrose résiduel et transférés dans un tube de 50 mL. Les sites où se trouvaient les culots viraux sur les tubes ont été rincés avec 2 mL de PBS que l'on a mis dans les mêmes tubes de 50 mL gardés à 4°C contenant déjà le sucrose infectieux résiduel. Les tubes à ultracentrifugation ont été rincés de la sorte à deux reprises. Les tubes de 50 mL à bouchons vissés, ont été agités doucement afin de défaire le plus possibles les culots en agrégats. Un traitement de 10 sec d'ultra-sons sur la glace a été nécessaire afin de défaire les culots de virus. Cela a été refait à deux reprises en laissant beaucoup de temps (environ 15 min) entre les traitements soniques afin de ne pas permettre une élévation de la température au sein de la soupe virale. Les deux tubes de 50 mL résultant ont été centrifugés à 2 000 g 20 min, et les surnageants versés dans un bécher froid sur glace recouvert de

papier aluminium. Un des culots a été décollé avec 5 mL de PBS et transféré dans l'autre tube. Le même tube a été rincé avec 5 mL de PBS supplémentaire. Les 10 mL résultants ont été agités pour dissolution et soniqués 3 x 10 sec tel ad hoc. Le tube a été centrifugé à 2 000 g 10 min et le surnageant vidé dans le bécher gardé sur la glace. Le culot a été resuspendu avec 10 mL de PBS, soniqué et centrifugé de la même manière. Le dernier surnageant a finalement rejoint le bécher sur glace. Un poids de sucrose égal à celui du volume de virus a été ajouté au bécher afin de le rendre à une densité de 50 % (p/p). Cette mesure a été vérifiée au réfractomètre et ajusté au besoin. Le mélange à 50% sucrose (p/p) a été réparti dans 6 tubes à ultracentrifugation (Beckmann) en portions égales et ultracentrifugé à 90 000 g à 4°C 90 min. Le surnageant a été recueilli dans une erlenmeyer de 500 mL et les culots jetés. Le surnageant a été dilué jusqu'à 26% (p/p) de sucrose avec du PBS stérile et ultracentrifugé de nouveau à 90 000 g 90 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et le virus se trouvant maintenant dans le culot a été resuspendu en PBS. La resuspension s'est faite en dissolvant les culots de façon très localisée à coups de 200µl de PBS jusqu'à l'obtention d'un volume total de 6 mL de virus concentré dans du PBS. Ce volume a été aliquoté et congelé à -80°C. Un test HA ainsi qu'un dosage protéique ont été effectués sur les aliquots.

3.2.2 Purification de la neuraminidase

La purification de la neuraminidase a été faite par chromatographie d'affinité sur colonnes avec un inhibiteur de la NA qui est l'acide N-(p-aminophényle) oxamique. La méthode est essentiellement celle de Cuatrecasas (1973). D'abord nous avons préparé une suspension virale de SwQC91 de 2 mL contenant 4 mg de virus dans le PBS à 1 % (v/v) du détergent non-ionique NP-40. Nous l'avons agitée doucement 60 min à TP avant d'ultracentrifuger à 90 000 g 60 min à 4°C, dans une ultracentrifugeuse Beckmann à l'aide d'un rotor SW-65L. Nous récupérons le surnageant contenant les molécules de NA dissociées. À ce surnageant ont été ajoutés 2 mL de tampon acétate 10x (voir annexe 1) et 16 mL d'eau, et l' A_{254} a été enregistrée. Après nous avons fait circuler 2 à 3 volumes de tampon acétate 1x à 0,1 % NP40 dans la colonne, laquelle contenait 5 mL de NAPOA activé au CNBr (Sigma). La colonne équilibrée a été perfusée deux fois de suite avec l'échantillon viral à une vitesse de 0,1 mL/min. La colonne a ensuite été lavée avec le tampon acétate 1x ne contenant pas de détergent NP40 jusqu'à ce que l' A_{254} de l'effluat soit nulle lorsque lue contre l'affluat. L'élution de la neuraminidase fixée sur la colonne s'est faite en faisant circuler un tampon d'élution 0,1M NaHCO₃ pH9,1 et en collectant les fractions de 1 mL dans des tubes de

verre en borosilicate contenant 100 μ L de tampon acétate 10x sans détergent. Nous avons collecté les fractions jusqu'à ce que l'élution fût complète et confirmée par une A_{254} approchant zéro lorsque lue contre le tampon d'élution. Le collecteur de fraction était automatique (LKB, Modèle 7001, Uppsala, Suède). Nous avons rassemblé les fractions contenant la NA éluee dans un sac à dialyse Spectrapor™ de porosité de 12 000 à 14 000 de PM (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA, USA) et nous avons dialysé 17 hs contre un volume 100 fois supérieur de PBS. Nous avons refait deux autres dialyses de quatre hs le lendemain avec du PBS frais à chaque fois. Finalement, la concentration protéique a été évaluée par dosage protéique au BCA (Pierce).

3.2.3 *Dosage protéique*

Le dosage protéique du virus purifié ainsi que de la NA purifiée, a été effectué par le test à l'acide bis-cinchronique (BCA) (Pierce Chemicals, Rockford, Illinois, USA). Nous avons d'abord créé une courbe étalon en testant 100 μ L contenant 0 ; 2,5 ; 5,0 ; 7,5 et 10,0 μ g d'albumine bovine sérique (BSA). Nous avons ensuite ajouté 1 mL d'une solution d'acide bicinchronique (voir annexe 1), et nous avons chauffé à 60°C 30 min. L' A_{562} a alors été lue au spectrophotomètre. Si la courbe étalon donnait un facteur de corrélation supérieur à 98 %, nous l'utilisons pour évaluer la concentration protéique des échantillons viraux dilués 50 x ayant subi le même traitement, en prenant soin de soustraire le bruit de fond pouvant être dû au PBS diluant le virus. Pour la NA purifiée, 5, 10 et 20 μ L non-dilués ont été dosés.

3.2.4 *Immunisation de souris*

Afin d'immuniser les souris, une solution de virus SwQc91 purifié a été traitée par une méthode adaptée de celle de Stahl-Hennig et collaborateurs (1992). Cette méthode consiste à ajuster la concentration de virus purifié à 10 000 HA dans du PBS et ajouter un volume égal d'éthyl-éther (Fisher, Ottawa, Canada) à 0,1 % Tween-20. Nous avons agité lentement pendant 30 min à TP, centrifugé à 1 500 g sur centrifugeuse (IEC, Needham Heights, Massachusetts, USA) pendant 10 min à 4°C. La phase organique supérieure a été décantée et de l'azote y a été bullé afin d'éliminer totalement l'éther dans la solution. Un dosage au test BCA a déterminé la concentration protéique de la soupe de virus dissocié et la concentration a été ajustée à l'aide de PBS stérile (N'Diaye, 1995). Pour immuniser des souris Balb/c femelles de 6 semaines (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA), nous avons

injecté par voie intra-péritonéale (ip) une dose de 500 μ L dont 250 μ L contenant 30 μ g de virus SwQc91 dissocié et 250 μ L d'adjuvant complet de Freund. Au moins trois autres rappels ip aux deux semaines ont été effectués avec des doses de 500 μ L dont 250 μ L contenaient 10 μ g de NA purifiée en solution PBS et 250 μ L étaient de l'adjuvant incomplet de Freund. Un dernier rappel intra-veineux (iv) caudal avec 200 μ L de PBS contenant encore 10 μ g de NA purifiée a été effectué (Harlow et Lane, 1988).

3.2.5 Fusion cellulaire

Lorsque les tests INA sur le sérum murin dilué 1/10 démontraient des inhibitions supérieures à 90 %, les souris étaient considérées comme immunes donc en mesure de fournir des anticorps dirigés contre la NA du virus SwQc91. Nous avons utilisé le protocole du "Current protocols in immunology" (CPI, 1991). Trois jours après le dernier rappel iv, le sang de la souris sélectionnée pour la fusion cellulaire a été prélevé par ponction cardiaque et le sérum récupéré pour tester en INA. La souris en agonie a été achevée par dislocation cervicale et sa rate a été prélevée dans une hotte à flux laminaire. Toutes les opérations à partir de ce moment ont été effectuées dans une hotte à flux laminaire procurant ainsi un environnement stérile. La rate a d'abord été coupée en cubes, triturée à l'aide d'un piston dans un Pétri stérile. Les splénocytes obtenus ont été lavés avec 10 mL de milieu de culture RPMI 1640 (Gibco, Grand-Island, NY, USA) à quelques reprises et recueillis dans un tube de 50mL jusqu'à ce qu'il ne reste plus que de la matière grasse blanchâtre dans le Pétri. Les splénocytes ont été filtrés dans un tamis de gazes stériles, centrifugés 5min à 2 000 g, et décantés en laissant 1 mL de surnageant. Le culot a été homogénéisé dans le 1 mL de surnageant laissé après décantation. Nous avons ensuite mesuré à la pipette le volume total exact incluant surnageant et culot afin de prélever 10 μ L et évaluer le nombre de cellules effectrices disponibles. Pour ce faire nous avons dilué 1/10 le dernier prélèvement dans une solution d'acécolysine (voir annexe1). Celui-ci a été laissé à TP environ 30 sec afin de permettre à l'acécolysine de lyser les globules rouges, suivi d'une dilution 1/100 en milieu de culture, et finalement une dilution 4/5 dans une solution de bleu de trypan. Ces dilutions ont permis d'évaluer le nombre de cellules effectrices sur une chambre de Petroff-Hausser (Hémacymètre). Une semaine avant la fusion cellulaire nous avons mis en culture dans du milieu RPMI 1640 10 % de sérum foetal bovin, des cellules de myélomes P3X63Ag8.653 (ATCC CRL 1580), ces dernières sont issues de la lignée de cellules de myélomes P3X63Ag8, mais contrairement à ces dernières elles ne sécrètent pas de chaînes d'immunoglobuline légères, ni lourdes (Kearney et al., 1979). Le flacon de culture (F75) de

cellules de myélomes est récupéré dans des tubes de 50 mL et centrifugé 5 min à 2 000 g, les culots cellulaires ont été recupérés et mis ensemble dans le même tube. Le volume exact de suspension cellulaire a été mesuré avant de prélever 10 μ L, faire une dilution 1/10 en milieu RPMI 1640, suivi d'une dilution 4/5 dans du bleu de trypan, afin d'en évaluer la quantité. Suite au dénombrement des cellules de myélomes et de splénocytes, nous avons mis dans un tube de 50 mL, les volumes de suspensions cellulaires nécessaires pour avoir 10x plus de cellules de rates que de cellules de myélomes, tout en utilisant tous les splénocytes disponibles. Nous avons centrifugé les deux types de cellules réunis 5 min à 2000 g et le surnageant a été rejeté. Le tube a été placé dans un b cher d'eau à 37 C et en agitant légèrement nous avons ajouté à l'aide d'une pipette, 1 mL de polyéthylène glycol 50 % pré-chauffé à 37 C, pendant 1 min goutte à goutte. Ensuite, nous avons ajouté 1 mL de milieu de culture RPMI 1640 à 2mM Glutamine et 50 μ g/mL de gentamycine, goutte à goutte pendant 1 min, et pré-chauffé à 37 C. Nous avons répété l'opération en ajoutant 7 mL du même milieu pendant 2 à 3 min. Après centrifugation à 2000 g à TP, le culot a été resuspendu à 2.5×10^5 cellule/ 200 μ L avec du milieu RPMI pré-chauffé à 37 C contenant cette fois-ci 10 % SFV, 10 % de HAT, 10 mM d'HEPES, en plus des 2 mM de glutamine et 50 μ g/mL de gentamycine. La suspension cellulaire splénocytes-myélomes a finalement été distribuée dans des plateaux de 96 puits à fond plat pour culture cellulaire (Sarstedt Inc., Newton, Massachusset,USA), à raison de 2.5×10^5 cellules par puits. Un témoin négatif pour démontrer l'impossibilité de fusion entre des cellules de myélomes en présence de 10 % HAT a aussi été fait en flacon F-25 en mélangeant 9 mL de milieu de culture et 1 mL de cellules de myélomes. Les plateaux et le témoin ont tous deux été incubés dans un incubateur à 37  C à 5 % CO₂ jusqu'au troisième jour.   partir du jour 3, ainsi qu'à tous les deux jours subséquents, 100 μ L par puits ont été remplacés par du milieu de culture frais contenant encore l'agent sélectif HAT   10 %. Au jour 7, parce que la croissance dans les puits était faible, nous avons ajouté des cellules nourricières de fibroblastes 3T3 irradiées issues d'embryons de souris (ATCC; CCL 163), lesquelles ne prolifèrent plus, mais sécrètent des facteurs de croissance donnant un élan multiplicatif aux hybridomes formés. Ces cellules nourricières étaient ajoutées dans le même milieu à raison de 2×10^5 cellules/mL.   partir du jour 12, le milieu ajouté aux puits a été remplacé par du milieu 10 % HT, c'est-à-dire contenant de l'hypoxanthine et de la thymidine sans l'agent sélectif aminoptérine. Ceci a été répété jusqu'à l'obtention de confluences cellulaires assez fortes pour débuter les criblages, c'est-à-dire environ 40 % de confluence (CPI, 1991).

3.2.6 Criblages des hybridomes sécréteurs d'AcMo

Lorsque les hybridomes ont atteint des confluences cellulaires de 40 %, nous avons procédé à un premier criblage par test ELISA tel que décrit précédemment. Nous avons utilisé comme antigène viral le virus SwQc91 et SwQc81, et comme première couche d'anticorps nous avons utilisé le surnageant de culture d'hybridome. Les hybridomes testés positifs ont été ensuite testés au test INA afin de sélectionner seulement ceux dirigés contre la NA. Les hybridomes testés positifs en ELISA et en INA, ont finalement été testés en IHA afin d'éliminer les hybridomes sécréteurs d'AcMo offrant des réactions croisées avec l'HA.

3.2.7 Étalement et clonage des hybridomes d'intérêt

Lorsque les hybridomes sécrétant des AcMo d'intérêt ont été identifiés, nous avons procédé à un étalement dans des puits et à un clonage par dilution limite des cellules provenant de chaque puits d'intérêt. Pour cela nous avons doucement resuspendu les cellules d'un puits d'intérêt contenant environ 200 μ L et les avons distribués en quatre puits de 50 μ L. Nous avons par la suite complété à 200 μ L avec du milieu complet RPMI 1640 frais. Quelques jours après incubation à 37°C et 5 % de CO₂, lorsque les confluences cellulaires étaient autour de 50 %, nous avons procédé à un clonage par dilution limite. Pour cela, nous avons testé et resuspendu ensemble les puits toujours d'intérêt. Nous avons prélevé 100 μ L qui ont été dilués 4/5 dans du bleu de trypan pour compter les cellules viables à l'hémacymètre. Nous avons centrifugé 5 min à 2000 g et resuspendu dans assez de milieu de culture RPMI 1640 complet pour pouvoir obtenir 5 cellules par puits dans une plaque de 96 puits. Après constatation macroscopique du clonage et une pousse à confluence de 50 % suivie de tests de criblages réussis, nous avons multiplié les hybridomes clonés afin de congeler en milieu RPMI 1640 complet sans SBF mais à 10 % de DMSO dans des ampoules au sein d'un congélateur à azote liquide (CPI, 1991).

3.2.8 Production de fluide d'ascite

Pour immunodéprimer des souris de 12 semaines, une injection a été pratiquée par voie ip une première fois avec 500 μ L de pristane (2,6,10,14, tétraméthyl pentadécane) (Aldrich Chemical Inc., Milwaukee, Wisconsin, USA). Une deuxième injection identique de pristane a été faite 2 semaines plus tard. Une semaine après, les hybridomes sécrétant des AcMo

d'intérêt ont été injectés à une concentration de 10^6 cellules/mL dans du PBS par voie ip. Le suivi des souris pour la production de fluide d'ascite s'est fait quotidiennement par palpation abdominale des souris. Vers la deuxième semaine, les souris survivantes étaient dépourvues du fluide d'ascite entourant les tumeurs provoquées par les hybridomes en croissance. Lorsque possible l'opération de récolte du fluide a été répétée quelques fois. Le prélèvement du fluide d'ascite était fait à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de calibre 18 G et versé dans une solution d'Alsever 10 % (Gibco, Grand-Island, N.Y., USA) afin d'empêcher la coagulation. Finalement une centrifugation à 1 000 g pendant 10 min, a permis de se débarrasser des lipides et des globules rouges. Les fluides d'ascites ont été aliquotés et conservés à -80°C (Harlow et Lane, 1988).

3.3 CARACTÉRISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

3.3.1 Idiotypie

L'isotype des AcMo a été déterminé, par la méthode d'immunodiffusion double en gel d'agarose selon le principe d'immunodiffusion double d'Ouchterlony (1958). Pour cela nous avons préparé une solution d'agarose (Seakem, Marine colloids Div, Fmc Corporation, Rockland, USA) 1 % dans du PBS à 0,01 % NaN_3 , lequel a été liquéfié par chauffage et coulé sur des lames de verre $9,0 \times 3,5 \times 0,5$ cm. Après solidification, à l'aide d'un poinçon à gel, nous avons creusé des trous d'un diamètre de 3 mm. Nous avons ensuite déposé $30 \mu\text{L}$ de surnageant de culture d'hybridomes dans un puits central et $10 \mu\text{L}$ des anti-sérum dans les puits périphériques. Les anti-sérum reconnaissant les chaînes lourdes étaient : anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgM (Pharmacia, Uppsala-Suède), et ceux reconnaissant les chaînes légères étaient: anti- λ et anti- κ (Miles Laboratories Inc., Etobicoke, Ontario, Canada). Nous avons placé les lames sur une plaque mise à niveau et recouverte d'une boîte hermétique pour contenir l'environnement humide. L'humidité était gardée avec un linge humide placé près des lames. Après une immunodiffusion de 17 h à TP, nous les avons mises dans un bain de PBS pendant 10 min. Les lames ont ensuite été recouvertes d'un papier Whatmann (W&R Balston Ltd., Angleterre) humide par-dessus lequel nous avons placé une pile de papier buvard surmontée d'un poids de 1/2 kg. Lorsque les gels étaient complètement déshydratés, ils ont été séchés au séchoir jusqu'à transparence et colorés 2 min par immersion au bleu de Coomassie (R-250) 0,5 % et lavés avec une solution de décoloration: 50 % eau 40 % méthanol et 10 % acide acétique. Lorsque le bruit

de fond laisse voir les précipitations antigènes-anticorps, les lames ont été séchées à l'air et photographiées au polaroid.

3.3.2 Purification des anticorps

La purification des AcMo a été effectuée par chromatographie d'affinité sur colonne, selon un protocole basé sur la méthode de Krugger et Hammond (1987). Nous avons centrifugé 2 mL de fluide d'ascite de chacun des AcMo à 10 000 g pendant 10 min à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Nous avons dilué le surnageant dans 18 mL de solution PBS à pH7,8 et nous avons déposé sur une colonne de chromatographie préalablement équilibrée avec du PBS pH7,8. Pour faire la chromatographie nous avons utilisé un gel d'agarose-Protéine A ImmunoPureRPlus™ (Pierce Chemical Co, Rockford, Illinois, USA) pour les AcMo 2D4 et 2H5. Nous avons passé le dépôt humoral à un débit de 0,5 mL/min et collecté 2 mL/tube. Le lavage des molécules non adsorbées sur les Protéines A a été fait avec 40 mL de PBS pH7,8 au même débit de perfusion. L'élution des AcMo s'est faite dans un environnement acide avec 20 mL d'acide citrique 0,1 M pH 3,0 et 4,5 pour les AcMo 2D4 et 2H5 respectivement. Les fractions ont été recueillies dans des tubes contenant préalablement 100 µL de Tris 2 M pH8,0. Nous avons rassemblé les fractions ayant une $A_{280} > 0,2$ et nous avons dialysé 2 x 2 h contre 2 L d'une solution PBS à 4°C en utilisant des sacs Spectrapor™ de porosité 12 000-14 000 de PM. Nous avons mesuré l' A_{280} et l' A_{250} au spectrophotomètre afin d'évaluer la concentration en IgG et la pureté de la préparation. Suite à ces déterminations nous avons aliquoté et congelé ces préparations à -80°C.

Comme l'AcMo 3A3 ne s'attachait pas à la protéine-A, nous avons dû utiliser un gel Sepharose-Protéine G 4Fast Flow™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). Les étapes de chromatographie ainsi que les paramètres expérimentaux étaient les mêmes, mais les tampons utilisés variaient. Le PBS a été systématiquement remplacé par du TBS (voir annexe 1). Le fluide d'ascite 3A3 a donc été dilué dans cette solution TBS. La colonne a également été équilibrée dans du TBS. Le lavage s'est fait avec une solution de TBS dont la concentration de NaCl a été amenée à 2.9 %. L'élution s'est faite avec une solution 0,1 M glycine pH 2,7 et recueillant les fractions dans des tubes contenant préalablement 66 µL de NaOH 1 N. La dialyse s'est faite contre du tampon PBS comme pour les deux autres AcMo.

Concentration d'immunoglobulines G

$$\sum_{1\%}^{280} \text{ pour IgG} = 14.4 \quad \text{Donc } 1\text{mg/mL} = 1.44 \text{ de } A_{280}$$

Pureté de la préparation d'Ig

$$\text{Coefficient de pureté} = \frac{A_{280}}{A_{250}}, \text{ une bonne pureté devrait donner } 2,5 \text{ à } 3,0$$

3.3.3 *Marquage des anticorps*

Les AcMo purifiés ont été marqués radioactivement afin de s'en servir en tests de compétition. Cette méthode mise au point dans notre laboratoire, utilise en partie la iodination des tubes avec le Iodogen™ (Pierce Chemical Co, Rockford, Illinois, USA) comme catalyseur (Harlow et Lane, 1988).

Dans un tube de 1,5 mL nous avons mis 100 µL contenant 5 µg de Iodogen™, il s'agit d'un agent oxydant catalyseur de la réaction de iodination. Après une évaporation de 18 h, ont été mélangé au sein de ce tube: 50 µg d'AcMo dans 45 µL de PBS; 50 µL de tampon phosphate 0,5 M pH6,0 (voir annexe 1) ; et 5 µL contenant 500 µCi d'iode-125 (ICN Pharmaceuticals, Inc). Nous avons incubé ce mélange pendant 10 min à TP et transféré ce volume réactionnel sur une colonne Sephadex G-50 saturée de PBS à 2% BSA. Suite à la pénétration de ce volume réactionnel, nous avons élué 6 fois avec 300 µL de PBS 2 % BSA et 0,02 % NaN₃. Les fractions de 300 µL (environ 2 gouttes) ont été recueillies dans des tubes de 1,5 mL. 10 µL de chaque fraction ont été prélevés et dilués 1/100 dans du PBS 2 % BSA, dans des tubes de verre 100 x 75 mm. Le nombre de coups par minutes (CPM) par tube a été mesuré dans un lecteur Beckmann Gamma 7000.

3.3.4 Tests de compétition par radioimmunoessai

Afin d'étudier les relations stériques des sites d'attachement des AcMo d'intérêt, nous avons utilisé une méthode mise au point dans notre laboratoire consistant à exploiter le pouvoir adsorbant des plateaux pour ELISA afin de faire un radioimmunoessai (RIA). Nous avons donc utilisé des plateaux à fond plat de 96 puits pour ELISA. Nous avons réparti 50 µL/puits de l'Ag viral qui est SwQc91 à 10 µg/mL dans un tampon d'adsorption (voir annexe 1) et gardé à 4°C pendant 18 h. Nous avons lavé 2 x les puits avec 300 µL/puits de solution de lavage (voir annexe 1). Ensuite nous avons saturé les puits avec une solution de saturation (voir annexe 1) pendant 90 min à TP. Nous avons lavé une fois les puits tel que décrit ci-haut. 50 µL des dilutions : 1/500 ; 1/1000 ; 1/2000 ; 1/4000 ; 1/8000 ; 1/16 000 ; 1/32 000 ; 1/64 000 ; 1/128 000 ; 1/256 000 ; 1/512 000 des fluides d'ascite de chaque AcMo ont été déposés au fond des puits d'une même rangée, en duplicata. Par-dessus ces mêmes puits, ainsi que dans des puits n'ayant reçu aucun fluide d'ascite, nous avons déposé 50 µL d'un AcMo marqué radioactivement à l'Iode-125 émanant 50 000 CPM. 60 min plus tard nous avons lavé 15 x avec 200 µL/puits tel que décrit précédemment. Finalement 200 µL/puits de NaOH 2 N ont été ajoutés, la réaction a été laissée 5 min et le tout a été prélevé avec un embout que l'on a déposé au fond d'un tube de verre 100 x 75 mm. 100µL de NaOH 2 N ont été remis, laissé 5 min et remis dans le même tube de verre avec l'embout contenant la matière radioactive éluée. Chaque tube de verre radioactif a été compté au lecteur Beckmann G-7000 pour en déterminer le nombre de CPM et pouvoir ainsi tracer des courbes de compétition.

Calcul des pourcentages de compétition

$$\% \text{ de compétition} = \frac{\text{cpm}_{(\text{Ag}+\text{AcMo}^*)} - \text{cpm}_{(\text{Ag}+\text{AcMo}^* + \text{AcMo de compétition})}}{\text{cpm}_{(\text{Ag}+\text{AcMo}^*)}} \times 100$$

où AcMo* est l'AcMo radioactivement marqué à l'iode-125.

3.4 ANALYSES MOLÉCULAIRES SUITE À L'ACTION D'AcMo ANTI-NA SwQc91

3.4.1 Sélection de virus variants

Pour tenter de sélectionner des mutants variants spécifiques aux AcMo fabriqués, une adaptation de la méthode originale de Gerhard et Webster (1978) a été utilisée. Pour cela nous avons utilisé du fluide d'ascite fait avec les hybridomes sécrétant les AcMo anti-NA que nous avons caractérisés. Nous avons mis en contact in vitro 500 µL contenant environ 500 HA de virus SwQc91, avec 4500 µL de fluide d'ascite non-dilué. Les contacts Ag-Ac ont duré 30 min à TP. Ensuite nous avons injecté stérilement 500µL à partir de chacune des solutions Ag-Ac, injecté stérilement par voie intra-allantoïdienne dans 10 oeufs embryonnés de poulet âgés de 11 jours. Les oeufs ont été incubés à 33°C pendant 48 h. Après 18 h à 4°C, les liquides allantoïques(LA) des oeufs ont été prélevés stérilement et individuellement, aliquotés et préservés à -80 °C. Toutefois une partie était gardée à 4°C afin de procéder immédiatement aux tests subséquents de caractérisation. Un test HA sur les LA nous a confirmé la présence de virus sur certains échantillons. Ceux-ci ont été clonés au minimum 2 fois sur oeufs, avant de subir les tests NA et INA pour identifier des variants antigéniques que l'on a clonés 2 fois en feuillettes de cellules MDCK et repassés sur oeufs pour en augmenter le titre HA.

3.4.2 Clonage des virus variants en oeufs

Pour cloner un virus sur oeuf, le virus a été dilué à 2 HA et nous avons, à partir de cette dilution, fait 4 dilutions sériées d'un facteur 10 dans du PBS. 5 oeufs embryonnés de 11 jours ont été injectés par voie intra-allantoïdienne avec 200 µL de chacune des dilutions virales. Suite aux 48 h à 33°C et aux 18 h à 4°C, le prélèvement des LA a été fait et ceux-ci ont été testés quant à leurs activités hémagglutinantes. Le dernier LA infecté titrant positivement en test HA et précédant le LA titrant négativement a été jugé comme contenant le virus cloné. Celui-ci a été dilué à 2 HA et cloné à nouveau de la même façon.

3.4.3 *Clonage des virus variants en cellules MDCK*

Afin de cloner les virus de façon plus sûre, nous avons opté pour un clonage en feuillets de cellules MDCK. Cette méthode a été adaptée de la méthode de Tobita et collaborateurs (1975) et de Oxford et collaborateurs (1982). Il faut d'abordensemencer des plateaux de six puits à fond plat pour culture cellulaire Linbro™ à raison de 5×10^5 cellules MDCK/puits dans 5 mL de milieu de culture DMEM™ (Gibco Life Technologies) porté à 10 % de SVF et à 50 µg/mL de gentamycine. Lorsque les puits devenaient confluents à 100 %, le surnageant de culture des puits a été enlevé et les puits lavés deux fois avec 1 mL de PBS stérile préchauffé à 37°C. Des dilutions sériées de facteur 10 allant de 10^{-2} à 10^{-6} dans du PBS stérile à 0,2 % BSA ont été préparées, avec lesquelles des puits de MDCK confluents ont été infectés. Au moins un puits par plateau n'a pas été infecté et constituait le témoin négatif comparatif. Nous avons ensuite adsorbé les virus dans un incubateur pendant 60 min à 37°C, en atmosphère humide, et à 5 % de CO₂. Nous avons régulièrement agité légèrement les plateaux afin de bien répartir le virus adsorbant partout au fond des puits. Après cette dernière étape nous avons recouvert les feuillets cellulaires infectés, avec 3mL par puits de milieu DMEM 2X contenant : 0,2% BSA ; 100 U/mL de gentamycine ; 0,2% de glucose ; 0,5% d'agar L-28™ (Oxoid Co, Londres, Angleterre) ; 100 µg/mL DEAE-Dextran; 1µg/mL trypsine TPCK (Sigma) ; et 0,2% Glucose. Nous avons laissé 30 min à TP sous la hotte à flux laminaire pour la solidification totale de l'agar, et incubé à 37°C à 5 % CO₂ en position inversée 48 h. Pendant les 72 h suivantes nous avons régulièrement vérifié les plateaux pour identifier les plages de lyse cellulaires isolée contenant notre virus cloné. Le virus était récupéré à l'aide d'une pipette Pasteur plantée dans l'agar au-dessus de la plage de lyse et la carotte de gel était ensuite éluée dans du PBS stérile pour fins de conservation à -80°C ou pour ensemencer de nouveau oeufs embryonnés de 11 jours.

3.4.4 *Traitements au DEPC*

L'ARN est beaucoup plus instable chimiquement que l'ADN, et les ARNases qui digèrent l'ARN sont présentes un peu partout dans l'environnement et même dans la verrerie de laboratoire parce qu'elles sont résistantes à l'autoclavage (Sambrook et al, 1989). C'est pourquoi nous avons dû traiter au diéthylepyrocarbonate (DEPC)(Sigma) toute la verrerie entrant en contact avec les ARN. Nous avons donc fait tremper la verrerie utilisée pour travailler l'ARN dans de l'eau bi-distillée filtrée à 0,15 % (v/v) DEPC pendant 18 h. Le

lendemain la verrerie a été très bien égouttée et autoclavée 20 min à 121°C. L'eau égouttée a été embouteillée et autoclavée comme la verrerie.

3.4.5 *Extraction de l'ARN viral*

Nous avons adapté pour le virus influenza, la méthode d'extraction de l'ARN de tissus d'organismes supérieurs mise au point par Chomczynski et Sacchi (1986). Nous avons donc pris 1 mL de LA infecté ayant un titre de 512 à 1024 HA, il a été clarifié par une microcentrifugation de 3000 g pendant 15min à 4°C. Le surnageant a été déposé dans un tube Beckman plastique pour rotor SW65L, préalablement lavé une fois avec du SDS, une autre fois avec de l'éthanol 70 % et très bien rincé avec de l'eau traitée au DEPC. Le LA a été ultracentrifugé dans un rotor Beckmann SW65L à 90 000 g pendant 60 min à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot viral gardé, auquel 200 µL de solution D (voir annexe 1) ont été ajoutés pour débiter l'extraction. Après une incubation de 10 min à 0°C sur de la glace, on a transféré le mélange dans un microtube traité au DEPC. Le tube d'ultracentrifugation a été rincé avec 300 µL de solution D que nous avons transféré en compagnie des précédents 200 µL dans le microtube. Dans ce dernier tube on a ajouté; 200 µL d'eau traitée au DEPC, 50 µL de sodium acétate 2M pH 4,0, 500 µL de phénol saturé d'eau (3,75 :1 v/v) (Gibco BRL) et 100 µL de chloroforme/isoamylalcohol de ratio volumique respectif 24:1, en prenant soin de bien agiter le microtube après chacun des ajouts. L'extraction s'est faite 15 min à 0°C sur glace. Suite à une microcentrifugation à 10 000 g réfrigérée à 4°C pendant 20 min, la phase aqueuse supérieure a été récupérée et transférée dans un autre microtube de 1,5 mL. 800 µL d'isopropanol ont été ajoutés à cette phase aqueuse afin d'y précipiter l'ARN pendant 2 h à -20°C. Suite à une microcentrifugation identique à la dernière, le surnageant a été jeté et le culot resuspendu dans 200 µL de solution D. S'en est suivi l'ajout de 1mL d'isopropanol et une précipitation de 3 à 18 h à -20°C. Une autre microcentrifugation de 10 000 g 20 min à 4°C s'en est suivi, et quoique le culot était peu apparent, celui-ci il a été lavé avec 500 µL d'éthanol 70 %. Une dernière microcentrifugation identique aux précédentes a permis d'enlever l'éthanol pour ne laisser assécher que le culot d'ARN sous une hotte chimique 15 à 20 min à TP. Les culots asséchés ont été resuspendus dans 10 µL d'eau traitée au DEPC auxquels nous avons préalablement ajouté 1 µL de RNAGuard™(Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède).

3.4.6 RT-PCR sur le gène de la NA

Nous avons commencé par mélanger au sein d'un microtube traité au DEPC: 9 μ L d'eau traitée au DEPC, 1 μ L de l'amorce NA F(22-36) à 50 pmole/ μ L, 1 μ L de RNAGuard™ à 24 600 U/mL et 1 μ L d'ARN viral. Le microtube a été chauffé 10 min à 70°C, conservé à 0°C sur glace 15 min et microcentrifugé 10 sec à 10 000 g. 4 μ L de 5xFirst Strand Buffer™ (Gibco BRL), 2 μ L de dithiothreitol (DTT) et 1 μ L de dNTP à 10 mM ont été ajoutés. Le microtube a été chauffé à 42 °C 2min, avant d'ajouter 1 μ L de la transcriptase inverse Superscript II™(Gibco BRL) à 200U/ μ L. Le chauffage s'est poursuivi à 42 °C pendant 50 min pour compléter l'ADNc. Ensuite nous avons chauffé à 70°C 15 min pour dénaturer l'enzyme transcriptase inverse. À partir de cette étape il n'y avait plus besoin de travailler avec de la verrerie traitée au DEPC, puisque nous ne travaillions plus avec de l'ARN. Le microtube d'ADNc a été gardé à 0°C sur glace environ 15 min suite au dernier chauffage, avant d'en prélever 2 μ L que l'on a transférés dans un autre microtube contenant le cocktail de polymérisation en chaîne qui suit: 77,5 μ L d'eau stérile ; 10 μ L de 10xPCRBuffer™(Gibco BRL) ; 3 μ L de MgCl₂ 50mM ; 2 μ L de dNTP 10mM ; 2,5 μ L de chacune des amorces NA(F22-36) et NA(R1417-1431) à 50 pmole/ μ L et 0,5 μ L de Taq DNA Polymérase™ (Gibco BRL) à 5 U/ μ L. Le mélange a été recouvert avec 50 μ L d'huile minérale stérile. Nous avons utilisé pour la réaction de polymérisation en chaîne l'appareil thermocycleur MiniCycler™ (MJ Research Inc., Watertown, Massachusetts,USA) et les paramètres de cycle suivants: 45 sec à 94°C; 60 sec à 55°C ; et 120 sec à 72°C, pour un total de 35 cycles, suivis d'un cycle de 10min à 72°C et d'une réfrigération à 4°C jusqu'à la récupération du microtube.

3.4.7 Clonage du gène de la NA

Nous avons d'abord préparé un gel d'agarose 0,8 % dans un tampon TEA (voir annexe1), en utilisant un peigne à dents pouvant mouler des puits pouvant contenir des volumes d'échantillons allant jusqu'à 25 μ L, mais dont la première dent destinée à accueillir le marqueur de PM était de petite taille, c'est-à-dire environ 10 μ L. Après solidification, nous avons mis le gel dans un appareil d'électrophorèse (Biorad, Hercules, CA,USA) dont la cuve était remplie tout juste assez pour recouvrir le gel avec du tampon TEA. Au fond d'un des gros puits nous avons mis 20 μ L du produit de RT-PCR en compagnie de 4 μ L d'une solution tampon d'échantillon (voir annexe 1). Au fond du premier puits nous avons déposé 2 μ L d'un mélange de marqueurs de PM 1Kb DNA Ladder™ (Gibco BRL) à 1 μ g/ μ L, de

tampon d'échantillon et d'eau, dans les ratio respectifs volumiques suivants ; 25:16,7: 58,3. La migration a été effectuée à 90 Volts pendant 45 min. Le gel a été submergé avec agitation lente dans une solution aqueuse à 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium pendant 45 min et ses bandes de produits RT-PCR, visualisées sous une lampe à rayons ultra-violets de longues longueurs d'ondes. Après avoir vérifié à l'aide des marqueurs de PM que la bande correspondait bien au gène de la neuraminidase amplifiée de 1410 nts, celle-ci a été découpée et transférée dans un microtube prépesé. Nous avons ajouté 2,75 volumes de NaI et incubé 5 min à 55°C. 5 µL de Glassmilk™(Bio101 Inc., LaJolla, CA,USA) ont été dispersés au sein du microtube, et il a été gardé à TP 5 min pour l'adhésion de l'ADN. Après avoir microcentrifugé à 10 000 g 10 sec, le surnageant a été jeté, le culot d'ADN/Glassmilk a été lavé 3 x avec 500µL de tampon NEW™ (Bio101) en resuspendant et microcentrifugeant 10 sec à 10 000 g entre chaque lavage. L'ADN a été élué du culot de Glassmilk™ avec 5 µL d'eau en incubant 2 à 3 min à 55°C. Nous avons microcentrifugé 30 sec à 10 000 g, et avons transféré le surnageant dans un autre microtube. Nous avons élué de nouveau avec 5 autres µL de façon identique. Après le transfert du surnageant dans le microtube contenant l'ADN, 2 µL en ont été prélevés et mis sur gel tel que déjà décrit afin de vérifier la réussite de la méthode de récupération du produit RT-PCR. L'enzyme TaqDNAPolymérase™(Gibco BRL) utilisée dans la réaction de polymérisation en chaîne, laissant à l'extrémité des amplicons un déoxyadénosine phosphate, a donné naissance à une série de plasmides exploitant ce phénomène pour pouvoir cloner ces amplicons. Pour cloner notre gène de neuraminidase, nous avons utilisé la trousse commerciale TA Cloning kit™(Invitrogen Co. San Diego, CA,USA). Nous avons mélangé au sein d'un microtube 2 µL d'eau, 1 µL de 10x Ligation Buffer™, 2 µL du plasmide PCR2.1™ à 25 ng/mL, 4 µL d'amplicon et 1 µL de T4 DNA Ligase™ à 4 U/µL. Pour finaliser notre clonage du gène de NA au sein du vecteur plasmidique, nous avons procédé à la ligation en incubant 18 h à 14°C.

3.4.8 Transformations de cellules INVαF'

Pour transformer des cellules compétentes INVαF'™(Invitrogen) avec notre plasmide PCR2.1™ recombinant, nous avons utilisé la méthode de choc thermique. Nous avons dégelé un tube de cellules INVαF'™, y avons ajouté 2 µL de β-mercaptoéthanol à 0,5 M, en agitant délicatement. 2 µL de produit de ligation ont été ajoutés au tube de cellules à 0°C sur glace, lequel a été laissé ainsi 30 min. Nous avons ensuite fait subir aux cellules un choc thermique de 30 sec en chauffant le microtube de cellules à 42°C. Suite au choc thermique le microtube a été mis sur glace 2 min et 450 µL de milieu SOC ont été ajoutés avant d'incuber

1 heure à 37°C avec agitation de 225 rpm. Nous avons préparé 3 pétris avec du milieu 2 x YT avec agar à 100 µg/mL d'ampicilline, lesquels ont été ensemencés par étalement avec 1 x 200 µL et 2 x 100 µL de suspension cellulaire transformée, avant d'être incubés à 37°C 18 h. À l'aide de cure-dents, les colonies ayant poussé ont été ensemencées sur un autre Pétris maître avec 2xYT-Agar 100 µg/mL d'ampicilline à cases numérotées de 1 à 100. Après en avoir cultivé une cinquantaine par incubation 18 h à 37 °C, les colonies de référence ont été gardées à 4°C.

3.4.9 Purification de l'ADN par la méthode d'ébullition

La veille de la purification de l'ADN plasmidique nous avons à l'aide d'un cure-dent stérile, piqué la colonie désirée et mis en éprouvette au sein de 2 mL de bouillon de culture 2xYT ampicilline 100µg/mL, suivi d'une incubation à 37°C 18 h avec agitation de 225 rpm. 1,5 mL de bouillon de culture a été microcentrifugé en microtube à 10 000 g 3 min, décanté et resuspendu en vortexant dans 300 µL de solution STET (voir annexe 1). Nous y avons ensuite ajouté 20 µL de tris-HCl 50 mM pH8,0 contenant 10 mg/mL de lysozyme, afin de vortexer et garder à TP 5 min. Nous avons placé le microtube dans un bain en ébullition 2 min, microcentrifugé 5 min à 10 000 g et immédiatement enlevé le culot à l'aide d'un cure-dent dont nous nous sommes départis. Au surnageant restant nous avons ajouté 300 µL d'une solution: 75 % isopropanol ; 2,5 M NH₄OAc. Après avoir vortexé et microcentrifugé à 10 000 g 5 min, nous avons décanté et lavé le culot avec 300 µL d'éthanol 70 %. Nous avons microcentrifugé de façon identique, décanté et laissé évaporer l'éthanol environ 15 min. Finalement le culot d'ADN plasmidique a été resuspendu dans 50 µL d'eau stérile.

3.4.10 Digestions par enzymes de restrictions

Parce que le processus de séquençage est long et onéreux, nous avons d'abord confirmé qu'il s'agissait bien du gène de la neuraminidase du virus influenza qui avait été cloné dans le plasmide PCR2.1™. D'abord nous savions d'après la séquence publiée de NASwQC91(GenBank #IAU 86 145), que ce gène ne comportait aucun site de restriction EcoRI, ni PstI, mais que par contre ce gène comportait un site de restriction BamHI. Mentionnons que le site EcoRI est important car il se trouve aux deux extrémités du site de clonage sur le plasmide et que son clivage libère complètement l'insert. Quant au site PstI, celui-ci est présent sur le gène de NP du virus SwQC91, et comme ce gène est le plus susceptible d'être

pris pour de la NA, vu sa longueur d'environ 1200 nts contre environ 1400 nts pour la NA, il était important d'écartier sa possibilité d'avoir été cloné. Pour effectuer les digestions, 6,5 μL d'eau, 2 μL d'ADN plasmidique, 1 μL de tampon réactionnel #3TM(Gibco BRL) et 0,5 μL d'enzyme de restriction EcoRITM 10U/ μL (Gibco BRL), ont été mélangés dans des microtubes de 1,5 mL. Après une brève agitation avec l'embout, nous avons incubé 60 min à 37°C et microcentrifugé 5 sec à 10 000 g. 6 μL de digestions ont été mis sur gel d'agarose avec du tampon d'échantillon tel que déjà décrit. Le gel a ensuite été coloré et photographié avec un polaroid sur un appareil avec illuminateur à rayons UV courts.

3.4.11 Purification d'ADN par méthode WizardTM Plus

Lorsque nous avons identifié les colonies contenant les plasmides d'intérêt pour le séquençage, celles-ci ont servi à ensemercer 20 mL d'un milieu 2xYT ampicilline 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. 18 h d'incubation à 37°C plus tard, trois microtubes de 1,5 mL étaient remplis de la culture bactérienne recombinante et furent microcentrifugés à 10 000 g 2 min. Nous avons ensuite décanté le surnageant et repris la manipulation précédente deux fois par-dessus les culots déjà obtenus, afin d'obtenir trois gros culots bactériens. Le restant de culture de cette étape était aliquoté en deux ou trois microtubes de 700 μL , auxquels nous avons ajouté 300 μL de glycérol stérile, homogénéisé autant que possible et congelé à -80 °C afin de conserver la souche à long terme. Après que les culots eurent été séchés à l'envers sur papier buvard, ils ont été resuspendus au vortex dans 300 μL de solution de resuspension (voir annexe 1). 300 μL de solution de lyse (voir annexe 1) ont été ajoutés et après avoir inversé quelques fois, la réaction a été faite 3min à TP. S'en est suivi l'ajout de 300 μL de solution de neutralisation (voir annexe 1) et nous avons mélangé par inversion et microcentrifugé à 10 000 g 5 min. Avec une seringue de 3 mL et une aiguille 18G, le surnageant du lysat centrifugé de chaque microtube est récupéré et mélangé chacun à 1 mL de de résine WizardTM(Promega, Madison, WI, USA). Les trois mélanges lysat/ résine ont ensuite été passés chacun dans une mini-colonne à filtre retenant la résine et l'ADN y étant adhérent, mais laissant passer le liquide. Pour laver le complexe ADN/résine, nous avons fait passer 2 mL dans les mini-colonnes de solution de lavage (voir annexe 1). La colonne a été asséchée avec le piston en passant de l'air pendant 30 sec et a été microcentrifugée à 10 000 g 30 sec dans des microtubes de 1,5 mL pour compléter le séchage. Une première mini-colonne a été transférée dans un autre microtube de 1,5 mL, à laquelle 50 μL d'eau préchauffée à 55°C ont été ajoutés, une incubation de 1 min à TP a suivi. Après microcentrifugation à 10 000 g 20 sec, nous avons vérifié la récupération de volume d'élution au fond du microtube et la mini-

colonne a été retirée. La deuxième et la troisième mini-colonne contenant les complexes ADN/résine ont chacun leur tour été manipulées de la même façon au-dessus du même microtube, pour obtenir un volume d'éluion final de 150 μL . Un μL de cette préparation d'ADN plasmidique a été dilué dans 199 μL d'eau, afin d'en lire les A_{260} et A_{280} au spectrophotomètre.

Quotient de pureté : $\frac{A_{260}}{A_{280}}$ un quotient de 2 indique une pureté parfaite à 100 % de la solution d'ADN

$$\text{Concentration } \mu\text{g}/\mu\text{L} \text{ d'ADN} = \frac{A_{260} \times 50 \mu\text{g}/\text{mL} \times 200}{1000\mu\text{L}}$$

50 est la constante spécifique de l'ADN signifiant qu'à $A_{260} = 1$, la concentration est de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

200 est le facteur de dilution

1000 est le dénominateur transformant des $\mu\text{g}/\text{mL}$ en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

3.4.12 Séquençage du gène de la NA

Le séquençage des gènes de NA a été fait au service de séquençage de l'IAF, qui utilise la méthode des didéoxynucléotides de Sanger et collaborateurs (1977) via un séquenceur automatisé ALF™ (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède). La stratégie de séquençage consistait à séquencer l'ADN double-brin inséré dans nos plasmides en utilisant 4 amorces. D'abord les amorces universelles UP (sens) et RP (anti-sens), lesquelles s'hybrident sur le plasmide aux abords de l'insert aux séquences du promoteur T7(5'-ccctatagtgagtcgtatta-3') et M13(5'-caggaacagctatgac-3'), respectivement. Pour compléter le séquençage du gène, deux autres amorces ont été utilisées, F(688-706)(ttagaacacaagagt) et R(735-752)(ctttactgtaatgactg).

4 RÉSULTATS

4.1 PREPARATION DE L'ANTIGENE VIRAL

4.1.1 Purification du virus influenza

Le virus influenza porcin A/Sw/Qc/5393/91 a été produit en liquide allantoïque d'oeufs embryonnés de 11 jours. Tel que montré au tableau I, le volume de la récolte de liquide allantoïque infectieux était de 5000 ml, avait une concentration protéique de 0,39 mg/ml, pour un total de 1930 mg de protéine. L'activité HA/mg protéine était alors de 1 350 HA/mg pour une activité totale de $2,6 \times 10^6$ HA.

Après la purification de ce liquide allantoïque infectieux, nous avons obtenu 7 ml de virus dans une solutions de PBS pH 7,2. La concentration de cette solution virale était de 4,86 mg/ml, pour un total de 34 mg. L'activité HA/mg de ce concentré viral était de 58 800 HA/mg, pour un total de 2×10^6 HA

La purification a permis une réduction volumique de 714x, un accroissement de l'activité spécifique HA/mg protéine de 43,6 x, et un rendement de 77 % en activité HA totale.

4.1.2 Purification de la sous-unité antigénique de NA

Comme nous le constatons au tableau II, nous sommes partis de 4 900 µg de virus pour en récupérer 112 µg, ce qui fait qu'en purifiant la NA par notre méthode nous avons récupéré 2,3 % de la totalité des protéines virales. Toutefois sachant qu'en théorie le pourcentage pondéral de la NA au sein du virus influenza est de 7 % (Bucher et Palese,1975), ce qui signifierait un départ neuraminidasique initial de 343µg, notre rendement effectif en termes de NA , serait de 32,7 %.

Tableau I Purification de virus influenza porcine

Résultats de purification de virus influenza porcine à partir de liquide allantoïque par la méthode de Arora et collaborateurs (1985), et resuspendu purifié dans du PBS pH7,2 . 5 litres de liquide allantoïque infecté ont été ultracentrifugés à 90 000 g à 4°C 1 h dans un gradient discontinu de sucrose 50 et 22 % (p/p). Les coussins de sucrose ont été rendus à 50 % de sucrose et ultracentrifugés 90 min dans les mêmes conditions, afin de se débarrasser de tout débris précipitant à >50% (p/p) de sucrose. Les surnageants ont été rendus à 22% (p/p) de sucrose et ultracentrifugés encore de la même manière afin de culoter le virus au fond des tubes d'ultracentrifugation et rejeter le surnageant ayant les débris précipitant à <22% de sucrose. Les culots ont été resuspendus dans 7 mL de PBS, le virus resuspendu a été dosé quant à sa concentration protéique par le test BCA™ (Pierce Chemicals Co., Rockford, Illinois, USA), et quant à son activité HA.

	Liquide Allantoïque Infecté	Virus Purifié
Volume (mL)	5000	7
Concentration Protéique (mg/mL)	0.39	4.86
Protéines Totales (mg)	1930	34
Activité Spécifique (x 10³ HA/mg)	1.35	58.8
Activité Totale (x 10⁶ HA)	2.6	2

Tableau II Purification de la neuraminidase du virus influenza porcin SwQc91 par chromatographie d'affinité

4900 µg de virus SwQc91 purifié, ont été resuspendus dans 2 mL final de PBS à 1% (v/v) NP-40. Après une agitation lente de 60 min à TP, nous avons ultracentrifugé à 90 000 g 60 min à 4°C dans un rotor SW-65L (Beckmann). Le surnageant a été récupéré et resuspendu à 50 mM NaAcétate, 2 mM CaCl₂, 0,2 mM EDTA pH5,5. Tel que décrit dans la méthode de Cuatrecasas (1973), la soupe virale a été chromatographiée sur colonne de NAPOA activée au CNBr. La NA liée au NAPOA a été éluée par une solution 0,1 M NaHCO₃ pH9,1. Les fractions de 1 mL de NA éluées ont aussitôt été mélangées à un tampon 10x (500mM NaAcétate, 20mM CaCl₂, 2mM EDTA pH5,5). Seul les fractions ayant donné une A₂₅₄ élevée ont été sélectionnées, rassemblées, et dialysées en PBS 2 x 3 h dans un sac à dialyse (Spectrapor 12 000-14 000). Un dosage protéique par le test BCA (Pierce) a été effectué. Le tableau montre tout d'abord en ; A) la quantité de virus purifié en protéines totales utilisée au départ de la purification de la neuraminidase, puis en B) la quantité de NA obtenue par la méthode décrite ad-hoc.

		Protéines totales (µg)	Récupération (%)
A	Virus purifié	4 900	100
B	NA purifiée	112	2,3

4.2 PRODUCTION D'HYBRIDOMES

4.2.1 Immunisation des souris

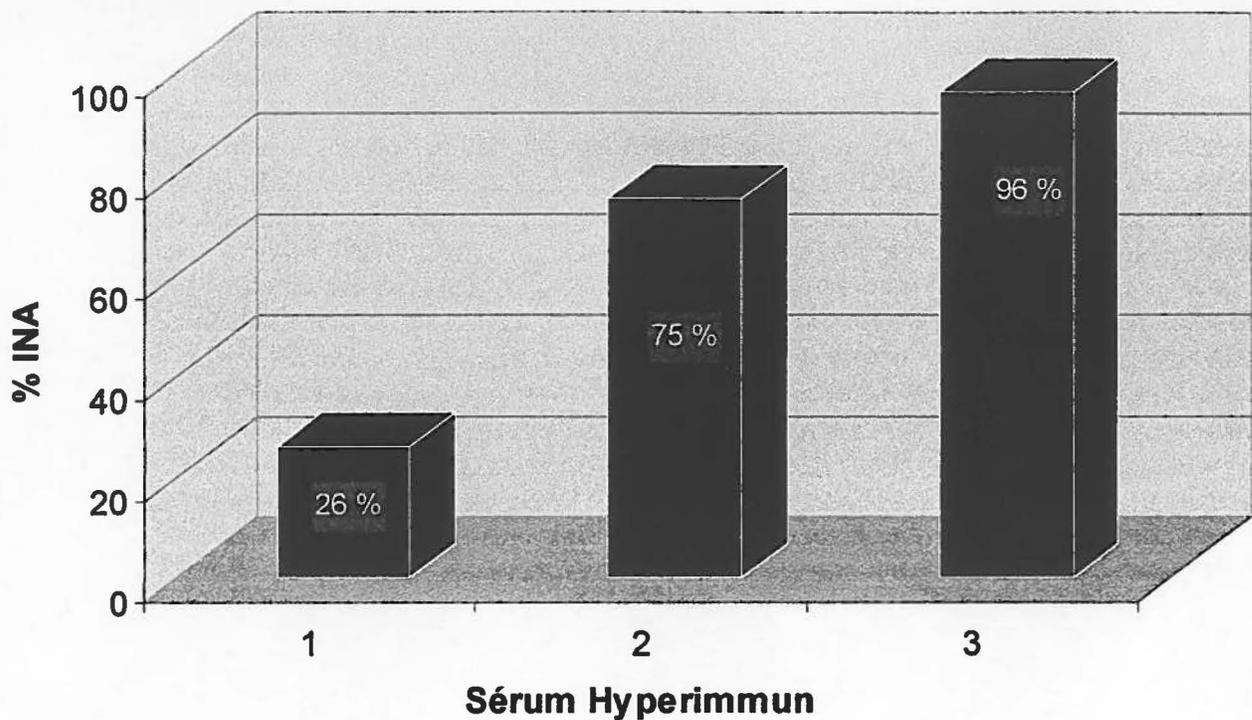
Au 3^e rappel, le sérum pré-immun et 3 dilutions de sérums hyperimmuns ont été comparés quant à leur activité INA. Le sérum pré-immun a donné un titre de 0 % INA, et les dilutions de sérums hyperimmuns 1/1000, 1/100 et 1/10, ont donné respectivement des titres de 21, 84 et 91 % INA.

Au 4^e rappel, le sérum pré-immun titrait 0 % INA, tandis que tel que vu sur la figure 3, les sérums hyperimmuns dilués 1/1000, 1/100 et 1/10, ont donné respectivement des titres de 26, 75 et 96 %.

4.2.2 Criblage des hybridomes

Lors de la fusion cellulaire, 17 surnageants d'hybridomes capables d'activité INA positive contre le virus SwQc91 ont été identifiés. Deux hybridomes, 3A3 et 2D4 ont été clonés et conservés. Dans une fusion précédente effectuée par Dr Arora utilisant la même méthodologie, un autre hybridome, 2H5, avait également été identifié, cloné et conservé.

Tel que vu au tableau III, ces trois surnageants d'hybridomes, 2H5, 3A3 et 2D4 offraient des A_{490} respectives de 1,7 ; 0,7 et 2,4 lorsqu'essayés en test ELISA contre SwQc91. De plus, toujours par ELISA, lorsqu'essayés contre l'antigène viral SwQc81, 2H5, 3A3 et 2D4, offraient des A_{490} respectives de 0,1 ; 0,1 et 2,0. Les surnageants de culture d'hybridomes 2H5, 3A3 et 2D4, ont donné respectivement 85 ; 90 et 53% d'INA. Les tests IHA utilisant encore le virus SwQc91 ont donné un titre IHA de 4 pour les trois mêmes surnageants testés, ces derniers étaient les plus bas titres IHA que nous ayons pu obtenir.



- 1 : Dilution 10^{-3} de sérum hyperimmun
 2 : Dilution 10^{-2} de sérum hyperimmun
 3 : Dilution 10^{-1} de sérum hyperimmun

Figure 3 Test INA sur le sérum d'une souris à terme pour une fusion cellulaire

Le sérum murin hyperimmun anti-NASwQc91 a été dilué 1/10 , 1/100 et 1/1000, en PBS pH7,2. 50 μ l de chacune des dilutions ont été utilisés pour inhiber l'activité neuraminidasique de 140 ng/50 μ L de virus SwQc91 pendant 18 h à 37°C, en utilisant la fétuine comme substrat à 2,5 mg/50 μ L. La révélation colorimétrique du substrat s'est faite tel que décrite par Aymard-Henry et collaborateurs (1973). Les pourcentages d'inhibition de la NA ont été calculés ainsi : $[1 - \{A_{549}(\text{épreuve}) - A_{549}(\text{témoin bruit de fond})\} / \{A_{549}(\text{témoin positif}) - A_{549}(\text{témoin bruit de fond})\}] \times 100$.

Tableau III Criblage d'hybridomes sécréteurs d'AcMo anti-NASwQc91

Les hybridomes ont été faits selon le protocole de fusion cellulaire décrit dans le Current Protocols in Immunology (1991), en utilisant les splénocytes de souris immunisées contre la NASwQc91 et les cellules de myélomes P3X63Ag9.653 (ATCC CRL 1580). Les hybridomes sélectionnés grâce à du milieu RPMI 1640 à 10% HAT ont été criblés par trois tests biochimiques. Le premier criblage était un essai ELISA vs. les virus SwQc91 et SwQc81. Ce test consistait d'abord à fixer le virus à une concentration de 10µg/mL dans un tampon d'adsorption (Na₂CO₃ 15mM, NaHCO₃ 35 mM, pH9,6) 18 h à 4°C. Les puits étaient alors saturés avec une solution de PBS ayant 2 % de BSA et 0,1 % de Tween-20, pendant 90 min à TP. Après 8 lavages, 50 µL de surnageant d'hybridomes ont été ajoutés aux puits laissés en contact 1 h à TP. Après un lavage identique, les AcMo ont été fixés avec un anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase de raifort dilué 1/5000 (Bio-Rad), lesquels ont été révélés avec un substrat colorimétrique (0,04 % (p/v) OPD, 0,012% (v/v) H₂O₂, 0,05 M acide citrique/0,1 M Na₂HPO₄ pH5,0), pendant 15 min à l'obscurité. La révélation a été arrêtée par 100 µL de solution d'arrêt H₂SO₄ 2 N. Le deuxième test de criblage était le test INA, utilisant le virus SwQc91 comme antigène. Pour le produire, 50 µL de surnageant d'hybridome a été mélangé à 140 ng/50µL de virus et incubés 1 h à TP. 50µL de fétuine à 50 mg/mL ont été ajoutés et le tout incubé 18 h à 34°C. Les réactions ont été révélées telles que décrites dans la méthode de Aymard-Henry et collaborateurs (1973). Le % INA a été calculé ainsi :
$$\left[1 - \frac{[A_{549}(\text{épreuve}) - A_{549}(\text{témoin bruit de fond})]}{[A_{549}(\text{témoin positif}) - A_{549}(\text{témoin bruit de fond})]} \right] \times 100$$
. Le troisième test de criblage était le test IHA tel que décrit dans le protocole du CDC (1982). Pour cela on a dilué 25 µL de surnageant de culture d'hybridome dans 25 µL de PBS de façon sérielle d'un facteur 2 au sein d'un plateau de 96 puits à fonds ronds. On a ensuite ajouté 50 µL de l'antigène viral standardisé à 8 HA et 50 µL de globules rouges de coq ont été ajoutés et laissés en hémagglutination de 45 min à TP. La dilution du dernier puits sur le plateau à ne pas offrir d'hémagglutination indiquait le titre IHA.

Hybridome	ELISA		INA	Titre IHA
	A ₄₉₀		(%)	
	vs. SwQc91	vs. Sw Qc81	vs. SwQc91	vs. SwQc91
2H5 A2	1,7	0,1	85	4
3A3 E3	0,6	0,1	90	4
2D4 B8	2,4	2,0	53	4

4.3 CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

4.3.1 Réactivité des anticorps monoclonaux

Les trois hybridomes; 2H5, 2D4 et 3A3 ont produit des fluides d'ascite très concentrés en anticorps monoclonaux. Ces fluides d'ascite ont été dilués 1000 fois dans du PBS et ont été testés en ELISA contre les souches SwQc91 et SwQc81. En INA ils ont été testés contre trois souches d'influenza porcines, SwQc91, SwQc81 et SwQcKlop. Le tableau IV indique que : en ELISA l'AcMo 2H5 reconnaît surtout le virus SwQc91 avec une A_{490} de 1,7 contre 0,1 pour le virus SwQc81. L'AcMo 2D4 reconnaît deux virus de cette étude en ELISA, le virus SwQc91 avec une A_{490} de 1,9 et SwQc81 avec une A_{490} de 1,0. Quant à l'AcMo 3A3, toujours en ELISA, semble ne reconnaître que le virus SwQc91 avec une A_{490} de 0,7 et le virus SwQc81, avec une A_{490} de 0,0. En test INA l'AcMo 2H5 inhibe l'activité neuraminidasique du virus SwQc91, SwQc81, et SwQcKlop avec des titres d'INA respectifs de 73, 8 et 5 %. L'AcMo 2D4 inhibe l'activité neuraminidasique du virus SwQc91, SwQc81 et SwQcKlop avec des titres respectifs de 58, 49 et 62 %. Quant à l'AcMo 3A3, il inhibe l'activité neuraminidasique du virus SwQc91, SwQc81 et SwQcKlop avec des titres respectifs de 88, 85 et 76 %.

4.3.2 Isotypie des AcMo

Sur les gels d'agarose faisant réagir les anticorps en caractérisation avec des sérums anti-chaînes lourdes et légères, nous avons constaté que chaque AcMo a réagi avec un sérum anti-chaîne lourde et un sérum anti-chaîne légère. Tel que vu sur la figure 4, l'AcMo 2D4 a précipité avec le sérum anti-IgG2b et avec le sérum anti- κ . L'AcMo 2H5 a précipité avec le sérum anti-IgG2a et le sérum anti- κ . L'AcMo 3A3 a précipité avec l'anti-IgG1, mais n'a pas réagi avec l'anti- κ .

Tableau IV Réactions en tests ELISA et INA des fluides d'ascite de trois anticorps monoclonaux anti-NASwQc91

Cinq souris pour chaque hybridome ont été injectées par voie ip au pristane (2,6,10,14, tétraméthylpentadécane) à deux reprises à deux semaines d'intervalle, avant d'être inoculées par voie ip une semaine plus tard avec 10^6 cellules d'hybridomes/mL dans du PBS. Les fluides d'ascite ont été obtenus par voie ip deux semaines plus tard autour des tumeurs des souris ayant été injectées avec les hybridomes 2H5 A2, 2D4 B8 et 3A3 E3. Des essais ELISA vs. les virus SwQc91 et Sw Qc81 ont été faits en utilisant des fluides d'Ascite dilués 1000 fois. Ce test requièrait l'utilisation de virus concentré et consistait d'abord à fixer le virus à une concentration de $10\mu\text{g/mL}$ dans un tampon d'adsorption (Na_2CO_3 15 mM, NaHCO_3 35 mM, pH9,6) 18 h à 4°C au fond d'un plateau de 96 puits pour ELISA. Les puits étaient alors lavés et saturés avec une solution de PBS 2 % BSA et 0,1% Tween-20, 90 min à TP. Après 8 lavages, 50 μL de la dilution de fluide d'ascite ont été ajoutés aux puits et laissés en contact 1 h à TP. Après un lavage identique, les AcMo ont été fixés avec un anti-IgG de souris conjugué à la peroxidase de raifort dilué 1/5000 (Bio-Rad), lesquels ont été révélés avec un substrat colorimétrique (0,04 % (p/v) OPD, 0,012 % (v/v) H_2O_2 , 0,05 M acide citrique/0,1 M Na_2HPO_4 pH 5,0), pendant 15 min à l'obscurité. La révélation a été arrêtée par 100 μL de solution d'arrêt H_2SO_4 2 N. Pour produire le test INA, 50 μL de dilution 1/1000 de fluide d'ascite ont été mélangés à 50 μL de virus en liquide allantoïque calibré pour donner une A_{549} de 0,8, pour être incubés 1 h à TP. 50 μL de fétuine à 50 mg/mL ont été ajoutés et le tout incubé 18 h à 34°C . Les réactions ont été révélées telles que décrites dans la méthode d'Aynard-Henry et collaborateurs (1973). Le % INA a été calculé ainsi : $[1 - \{ [A_{549} (\text{épreuve}) - A_{549} (\text{témoin bruit de fond})] / [A_{549} (\text{témoin positif}) - A_{549} (\text{témoin bruit de fond})] \}] \times 100$. Les abréviations sont INA ; inhibition de la neuraminidase, ip ; intra-péritonéale, OPD ; ortho-phénylène-diamine-benzène, ND ; non-déterminé.

a)	2H5 A2	ELISA	INA
		A₄₉₂	(%)
	SwQc91	1,7	73
	SwQc81	0,1	8
	SwKlop	ND	5
b)	2D4 B8	ELISA	INA
		A₄₉₂	(%)
	SwQc91	1,9	58
	SwQc81	1,0	49
	SwKlop	ND	62
c)	3A3 E3	ELISA	INA
		A₄₉₂	(%)
	SwQc91	0,7	88
	SwQc81	0,0	85
	SwKlop	ND	76

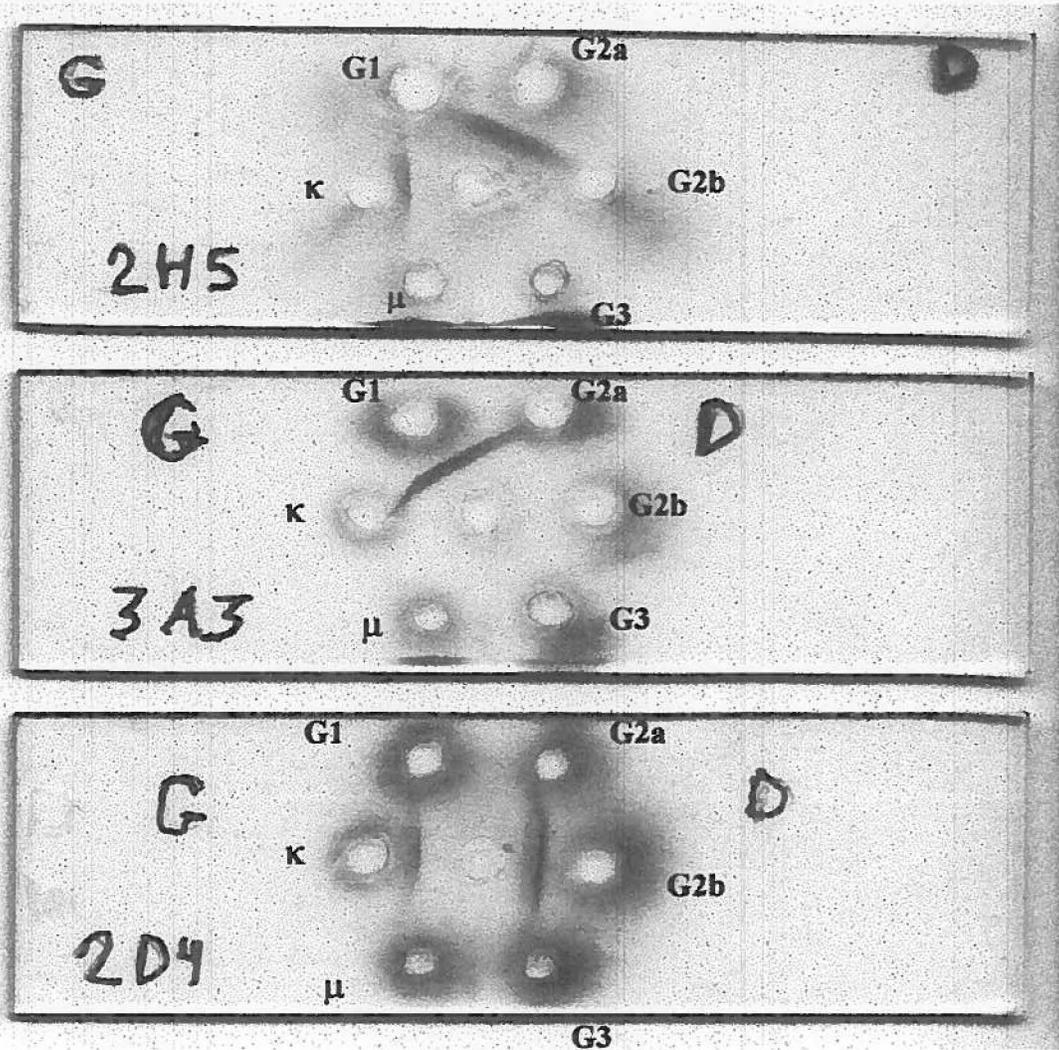


Figure 4 Isotype des anticorps monoclonaux anti-neuraminidase

L'isotype des AcMo a été déterminé par immunodiffusion double en gel d'agarose 1%, en utilisant 30 μ L de surnageant de culture d'hybridome dans le puits central et 10 μ L des anti-sérums anti-IgG1, anti-IgG2a, anti-IgG2b, anti-IgG3, anti-IgM et anti- κ , dans les puits périphériques. Après 17 h à température ambiante dans un environnement humide, les bandes de précipitine ont été colorées 2 min au bleu de Coomassie R-250. Image digitalisée avec logiciel iPhoto Plus4

4.3.3 *Compétitions en RIA*

Lorsque l'AcMo 2H5 marqué radioactivement à l'iode-125 a été mis en compétition avec les anticorps 2D4 et 3A3 en RIA, les courbes de compétitions ont montré une faible compétition des anticorps 2D4 et 3A3, comme en fait foi la figure 5a. Les AcMo 2D4 marqués radioactivement à l'iode-125 lorsque mis en compétition avec les anticorps 2H5 et 3A3 en RIA, ont montré toujours d'après l'allure des pentes, une forte compétition de l'anticorps 3A3 et une compétition plutôt réduite par l'anticorps 2H5 (figure 5b). Quant à l'AcMo 3A3 marqué radioactivement à l'iode-125, lorsqu'en compétition avec les anticorps 2H5 et 2D4, montraient d'après les courbes de fortes compétitions par les deux anticorps (figure 5c).

4.4 *CREATION DE VARIANTS ANTIGENIQUES*

4.4.1 *Inhibition des infections par les AcMo*

Suite à l'inoculation de 3 séries de 10 oeufs avec 50 HA de virus SwQc91 en suspension dans les fluides d'ascite purs 2H5, 2D4 et 3A3 (voir tableau V colonne I et II), nous avons inhibé au-dessous du seuil détectable l'infection dans 70 % des oeufs avec 2H5, 10 % des oeufs avec 2D4 et 30 % des oeufs avec 3A3. Comme nous le constatons à la colonne III du tableau V, les liquides allantoïques infectés ayant échappés à l'action des AcMo ont été testés en hémagglutination et ont donné des titres très variables allant de 4 à 1024 HA. Dans cinq cas; V653/1, V2H5/5/6, V2D4/9 et V3A3/5 les titres HA ont augmenté après deux clonages en oeufs(voir tableau V, colonne IV). Dans trois cas; V2D4/6 et V3A3/7/9, les titres sont restés identiques, et dans quatre cas V2H5/2, V2D4/1/8 et V3A3/6 les titres ont baissé.

4.4.2 *Titres INA après clonages en oeufs*

Tel que l'on peut voir à la colonne V du tableau V, après deux clonages en oeufs, les virus ayant échappé à l'AcMo 2H5 possédaient des titres INA de 92, 25 et 27 % contre 80 % pour le virus parental SwQc91. Les virus ayant échappé à l'AcMo 2D4, possédaient des titres INA de 16, 10 et 0 % contre 41 % pour le virus parental. Les virus ayant échappé à l'AcMo 3A3 ont donné des titres de 5, 2 et 0 % contre 100 % pour le virus parental.

Figure 5 Courbes de compétitions entre les anticorps monoclonaux anti-NASwQc91

Après avoir adsorbé le virus SwQc91 à 10 µg/mL de PBS au fond des puits d'un plateau ELISA de 96 puits 18 h à 4°C dans une solution basique à pH 9,6 50 mM NaHCO₃, nous avons lavé le plateau avec 300 µL/ puits de solution de lavage ; 0,05 % Tween-20 dans PBS pH 7,4. Nous avons saturé les puits avec une solution de PBS à 1 % BSA ; 0,1 % Tween-20 ; 0,02 % NaN₃, pendant 90 min à TP. 50 µL des dilutions : 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/8000, 1/16 000, 1/32 000, 1/ 64 000, 1/128 000, 1/256 000 et 1/512 000 des fluides d'ascite de chaque AcMo ont été déposés au fond des puits d'une même rangée en duplicata. 50 000 CPM de chaque AcMo marqué radioactivement à l'iode-125 (AcMo*), ont été ajoutés à chaque puits. Après avoir lavé 15 fois chaque puits, nous avons recueilli la radioactivité de chaque puits avec 1 x 200 µL et 1 x 100µL de NaOH 2N en laissant un contact de 5 min à chaque fois. La radioactivité en CPM de chaque puits a été lue au compteur Beckmann G-7000. Le calcul des pourcentages de compétitions a été calculé ainsi ; % de compétition = [cpm puits _(Ag+AcMo*) - cpm puits _(Ag+AcMo*+AcMo testé)] / cpm _(Ag+AcMo*) où AcMo* est l'AcMo radioactivement marqué à l'iode-125. a) courbes utilisant l'AcMo* marqué 2H5, b) courbes utilisant l'AcMo* marqué 2D4, c) courbes utilisant l'AcMo* marqué 3A3. Mentionnons que chaque point sur les courbes représente la moyenne de duplicata et que les droites ont été tracées suivant la règle des moindres carrés.

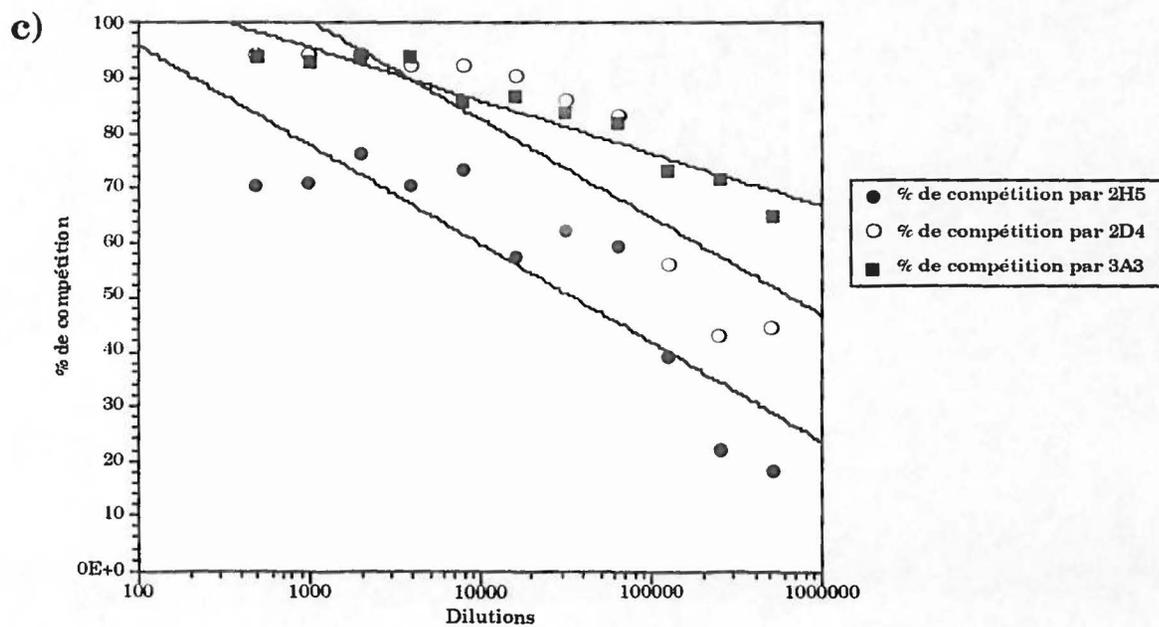
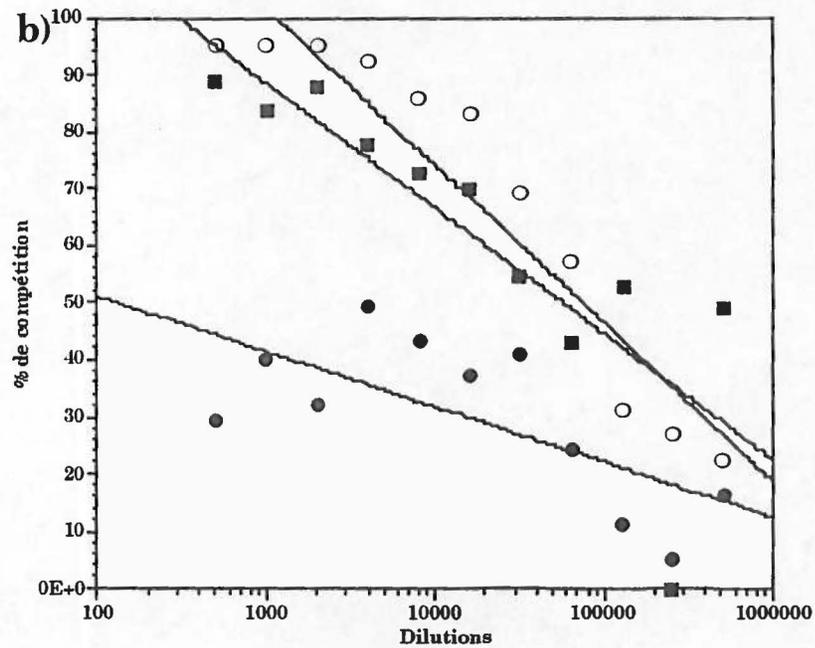
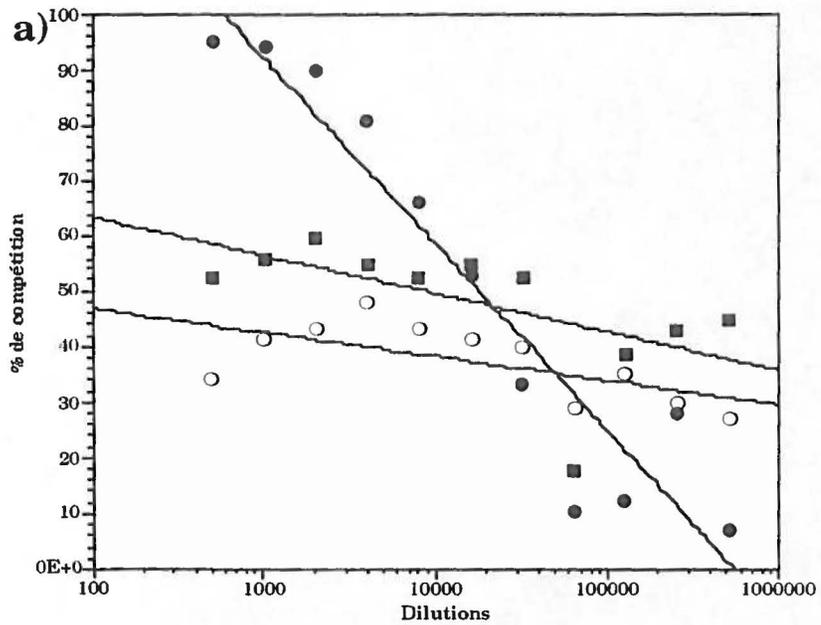


Tableau V Préparation in-ovo de variants antigéniques de virus influenza porcin (A/Sw/Qc/5393/91)

50 HA de virus SwQc91 ont été cultivés en œufs en présence de fluide d'ascite non-dilué contenant, en A) Aucun anticorps, en B) l'AcMo 2H5, en C) l'AcMo 2D4, et en D) l'AcMo 3A3. Ce procédé a été fait en accord avec la méthode de Gerhard et Webster (1978). Les tests d'inhibition de la neuraminidase ont été faits selon la méthode adaptée de Aymard-Henry, (1973). Les clonages en feuillets de cellules MDCK ont été faits selon la méthode adaptée de Tobita et collaborateurs, (1975). La sélection des variants antigéniques à cloner et séquencer a été faite d'après la perte de l'activité INA des AcMo sur les variants.

I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Identification	Oeuf#	Au 1er passage en oeufs	Au 2e clonage en oeufs		Clonages en cellules MDCK		Au 2e clonage en cellules MDCK	
		Titre HA	Titre HA	Titre INA (%)	1er UFP	2e UFP	Titre HA	Titre INA (%)
A) V653	1.	64	1024	0 sans AcMo 80 avec 2H5 41 avec 2D4 99 avec 3A3	4×10^5	9×10^4	1024	0 sans AcMo 80 avec 2H5 37 avec 2D4 100 avec 3A3
	2.	64	32	92				
	5.	8	256	25	TNC	TNC		
B) V2H5	6.	4	2048	27	$>200 \times 10^6$	4×10^6	2048	0
	1.	256	128	0	3×10^2	4×10^5	1024	2
	6.	1024	1024	16	37×10^6		1024	
	8.	512	16	10	11×10^2	11×10^7	1024	0
C) V2D4	9.	512	2048	0	0	6×10^4	512	0
	5.	128	256	2	0	1×10^3	0	
	7.	128	128	0	0	2×10^5	0	
D) V3A3	9.	256	256	5	0	2×10^2	512	100

Légende:

UFP : Unités formant des plages

INA : Inhibition de la neuraminidase

TNC : Trop nombreux pour être compté

V653 : Variant sélectionné avec fluide d'ascite 653 témoin sans AcMo

V2H5 : Variant sélectionné avec fluide d'ascite 2H5

V2D4 : Variant sélectionné avec fluide d'ascite 2D4

4.4.3 Titres INA après clonages en cellules MDCK

Nous voyons à la colonne IX du tableau V les virus ayant échappé aux AcMo 2H5 et 2D4 ayant eu des titres INA beaucoup plus bas que le virus parental SwQc91 et ont été clonés deux fois en feuillets de cellules MDCK. Toutefois les virus ayant échappé à l'AcMo 3A3, n'ont donné aucune plage virale sur les feuillets de cellules MDCK, et cela pour les deux premiers clonages. Au troisième clonage, quelques plages (une ou deux) sont apparues dans trois puits, mais deux d'entre eux n'ont pas donné d'infection en oeufs puisqu'aucun titre HA n'a été détecté après infection de ceux-ci. Une des plages a résulté en virus issu d'une sélection par 3A3 et a donné un titre infectieux de 512 HA après une infection en oeuf, par contre le titre INA retrouvé n'était plus caractéristique d'un variant antigénique. Ce dernier titre INA était de 100 % , alors que pour tous les autres virus; V2H5/6 et V2D4/1 ayant subi le même processus, les titres INA sont restés caractéristiques de virus variants, c'est-à-dire qu'ils avaient de titres de 0 à 2 % respectivement contre 80 et 37 % pour le virus parental.

4.5 IDENTIFICATION DES EPITOPES SPECIFIQUES AU NIVEAU DU GENE NA

4.5.1 RT-PCR sur les gènes de NA

À la figure 6, nous pouvons voir les gènes amplifiés par RT-PCR de neuraminidase issus des virus variants V2H5 et V2D4 et également, le gène amplifié de la neuraminidase issue du virus témoin V653. Tous les gènes amplifiés semblent avoir un PM d'environ 1,4 Kpb par comparaison à l'échelle de PM.

4.5.2 Digestion des plasmides recombinants

Nous voyons à la figure 7, une confirmation de l'identité du gène de NA. En effet, les digestions par les enzymes de restriction EcoRI, EcoRI/BamHI et EcoRI/PstI, sont caractéristiques pour le gène de NA issu de trois plasmides recombinants différents. Notons que le gène de NA possède un site de restriction BamHI et aucun site PstI. Cela nous permet de confirmer l'absence du gène NP (1200pb) au sein de nos plasmides, lequel possède un site PstI et donnerait ainsi un autre profil de digestion (voir annexe 2 pour carte de restriction du plasmide PCR2.1 recombinant).

Figure 6 RT-PCR sur les gènes de NAV653, NAV2H5 et NAV2D4

Une extraction d'ARNv du virus témoin parental et des virus variants V2H5 et V2D4 a été faite, en centrifugeant à 90 000 g du liquide allantoïque clarifié. Les culots obtenus ont été dissous avec 200 µL de solution D 10 min sur de la glace. La soupe a été transférée dans un microtube, dans lequel on a rajouté 300 µL de solution D supplémentaire, 200 µL d'eau traitée au DEPC, 50 µL de sodium acétate 2 M pH4.0, 500 µL de Phénol saturé d'eau et 100 µL de chloroforme/isoamylalcohol (24 :1), en agitant vigoureusement entre chaque ajout. Une centrifugation de 10 000 g à 4°C, de l'extraction de 15 min à 0°C a été faite. La phase aqueuse a été transférée dans un autre microtube avec 800 µL d'isopropanol, et incubé 2 h à -20°C. Une centrifugation identique à la dernière a permis de resuspendre le culot dans 200 µL de solution D et complété avec 1 mL d'isopropanol pour une incubation de 3h à -20 °C. Le culot obtenu après une centrifugation de 10 000 g a été lavé avec 500 µL d'éthanol 70 %, et le culot récupéré par une nouvelle centrifugation. Le culot d'ARNv a été dissout dans 10 µL d'eau traitée au DEPC contenant 1 µL de RNAGuard™(Pharmacia Biotech,Uppsala,Suède) à 24 600 U/mL. La réaction de transcription inverse a été faite avec 9 µL d'eau traitée au DEPC, 1 µL de l'amorce NA(F22-36), 1 µL de RNAGuard™ et 1 µL d'ARNv. On a chauffé 10 min à 70°C, conservé 15 min à 0°C, pour ensuite ajouter 4 µL de 5xFirst Strand Buffer™(GibcoBRL), 2 µL de DTT(GibcoBRL), 1 µL de dNTP (Pharmacia) à 10 mM et 1 µL de SuperscriptII™(GibcoBRL). La réaction a eu lieu à 42°C 50 min et l'enzyme dénaturée 15 min à 70°C. 2 µL de cette suspension ont été utilisés pour la réaction PCR au sein du cocktail suivant ; 77,5 µL d'eau stérile, 10 µL de 10xPCRBuffer™(GibcoBRL), 3 µL de MgCl₂ 50 mM, 2 µL de dNTP 10 mM, 2,5 µL des amorces NA(F22-36), et NA(R1417-1431) à 50 pMole/µL, 0,5 µL de TaqDNA polymérase™(GibcoBRL) 5U/uL, le tout recouvert de 50 µL d'huile minérale stérile. Un thermocycleur (Minicycler, MJ Research, Watertown, Massachussets, USA), a été utilisé pour compléter 35 cycles ; 45 sec à 94°C, 60 sec à 55°C, et 120 sec à 72°C. 10 µL des réactions RT-PCR joint à 2 µL de tampon d'échantillon (Bleu de bromophénol 0,25 % (p/v),xylène cyanol 0,25 % (p/v), et 30 % glycérol) ont été mis sur un gel d'agarose 0,8 %, sur lequel on a procédé à une électrophorèse de 45 min à 90 Volts. Le gel a été coloré au bromure d'éthidium 0,5 µg/mL 45 min et photographié avec exposition à des rayons UV. Au puits 1 ; un marqueur de PM, 1KbDNALadder™(GibcoBRL), au puits 2 ; produit RT-PCR du gène NAV 653, au puits 3 ; produit RT-PCR du gène NAV 2H5, au puits 4 ; produit RT-PCR du gène NAV 2D4. Photo digitalisée à l'aide du logiciel iPhoto Plus4.

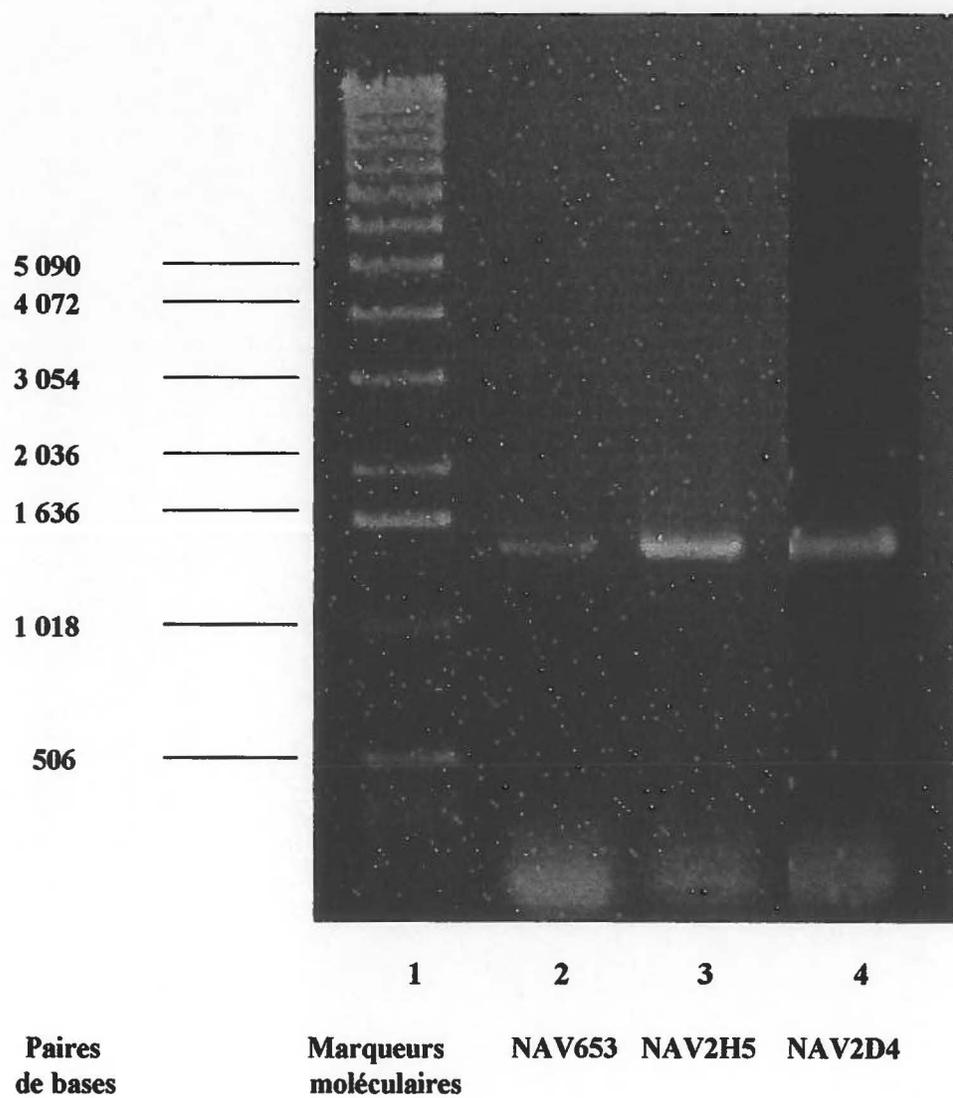
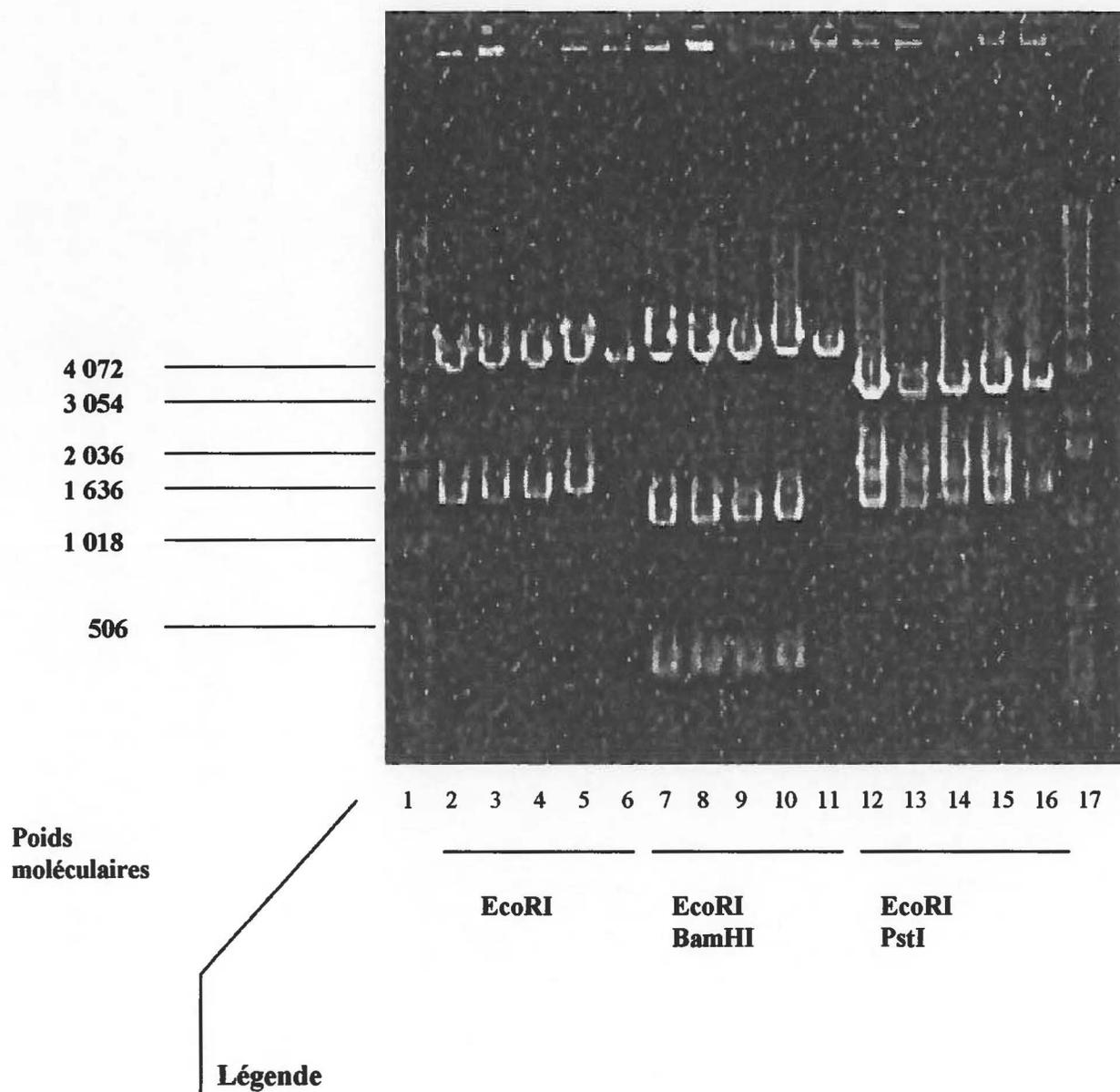


Figure 7 Digestion de plasmides recombinants PCR2.1/NAV2H5 avec les enzymes de restrictions EcoRI, BamHI et PstI

2 μL d'ADN plasmidique ont été digérés et analysés par électrophorèse en gel d'agarose. La digestion s'est effectuée avec 0,5 μL d'enzymes de restriction à 37°C 60 min. 6 μL ont été mis sur gel d'agarose 0,8 % en compagnie de 2 μL de tampon d'échantillon (Bleu de bromophénol 0,25 % (p/v), xylène cyanol 0,25 % (p/v), et 30% glycérol). Une électrophorèse a été effectuée sur le gel pendant 45 min à 90 Volts, avant d'être coloré au bromure d'éthidium 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ pendant 45min, et photographié en illumination UV. La photo a été digitalisée grâce au logiciel iPhoto Plus4.



Puits 1 et 17 ; Marqueurs de poids moléculaires 1KbDNALadder™(GibcoBRL)
 Puits 2, 7 et 12 ; Plasmide Recombinant PCR2.1/NAV2H5/C1
 Puits 3, 8, et 13 ; Plasmide Recombinant PCR2.1/NAV2H5/C5
 Puits 4, 9 et 14 ; Plasmide Recombinant PCR2.1/NAV2H5/C7
 Puits 5, 10 et 15 ; Plasmide Recombinant PCR2.1/NAV2H5/C11
 Puits 6, 11 et 16 ; Plasmide PCR2.1

4.5.3 *Mutations non-spécifiques*

La séquence nucléotidique du gène de NA du virus SwQC91 (NAQC91) publiée par Arora et collaborateurs (1997b), a été utilisée comme référence de comparaison. C'est ainsi que nous avons comparé la séquence neuraminidasique (NAV653) d'un virus ayant été sélectionné par du fluide d'ascite de myélome 653, donc n'ayant pas d'AcMo. Ce virus a été appelé V653, et a servi à discriminer les mutations pouvant n'être dues qu'aux simples passages dans les cellules hôtes utilisées. Tel que constaté sur la figure 8, l'analyse comparative NAQC91 vs. NAV653 a révélé qu'il y avait trois positions nucléotidiques (55, 110 et 1175) où se produisaient des transitions résultant en des mutations non-silencieuses aux positions protéiques 19, 37 et 392. Sur la même figure, on peut voir qu'en position 19 se trouvant dans la portion transmembranaire de la molécule une valine est la plupart du temps remplacée par une isoleucine un autre AA hydrophobe. La Ser en position d'AA 37 s'est vue transformée en Pro sur une des trois colonies séquencée, tandis qu'en position AA 392 se trouvant dans la tête globulaire de la molécule de NA, une glycine était remplacée par un aspartate. Mentionnons que la mutation du 110^e nt ou position d'AA 37 contrairement aux deux autres mutations, ne s'est pas retrouvée parmi les NA des autres virus variants étudiés (NAV2H5 et NAV2D4).

4.5.4 *Mutations spécifiques aux AcMo*

En comparant les séquences des gènes de NAV2H5 et NAV2D4 versus NAQC91, nous avons retrouvé les mutations non-spécifiques 19 et 32 mentionnées dans la section précédente, en plus de mutations spécifiques (voir figure 8). C'est-à-dire qu'en comparant les séquences de NAV2H5 vs. NAV653, une seule mutation non-silencieuse, une transition au nucléotide 817 se traduisant par une mutation en position protéique 273 d'une asparagine pour un aspartate (voir figure 9). En comparant NAV2D4 à NAV653, nous avons également trouvé une seule mutation non-silencieuse. En effet en position nucléotidique 1158 une autre transition faisait muter une sérine pour une arginine en position protéique 386. Quant à V3A3/31, sa séquence nucléotidique NA était identique à la séquence de NAV653.

Figure 8 Séquences nucléotidiques des gènes de neuraminidase des virus variants et parentaux

Alignement des séquences nucléotidiques codantes des gènes de NA des virus variants V2H5, V2D4, V653 et parental (NAQC91). Les séquences de gène NA des virus variants a été obtenu par la méthode des didéoxyribonucléotides (Sanger et al., 1977) sur séquenceur automatisé ALF (PharmaciaBiotech, Uppsala, Suède). Les anorces utilisées pour le séquençage étaient les deux oligonucléotides sens : UP (5'ccctatagtgagtcgtatta-3') et F(688-706)(5'ttaagaacacaagagt), tandis que les deux oligonucléotides anti-sens utilisés étaient : RP(5'caggaaacagctatgac3') et R(735-752)(5'cttactgtaatgactg3'). Le séquençage de chaque gène a été effectué sur trois différents clones bactériens INV α F' recombinants ayant le gène NA inséré dans le plasmide PCR2.1™ (InVitroGenCo, sanDiego,CA, USA). La séquence de NA du virus sauvage parental SwQc91 a été obtenue du GenBank (U86144). La numérotation non-soulignée est celle des positions en acides aminés telles que définies dans la séquence du gène parental NASQc91 du GenBank. Les mutations dues aux passages sont encadrées en pointillé, et les mutations variants spécifiques sont encadrées en trait plein.

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300
 NAQC91 Asn Ile Ser Asn Ile Asn Ile Ala Ala Gly Gln Asp Val Thr Ser Ile Ile Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala Ile
 AACATTAGC AATATCAACA TTGCTGCTGG ACAGGATGTG ACTTCAATAA TACTAGCCGG CAATTCCTCT CTTTGCCCAA TAAGTGGGTG GGCTATATAC

NAV653 -----

NAV2H5 -----

NAV2D4 -----

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400
 NAQC91 Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Ile Phe Val Ile Arg Glu Pro Phe Ile Ser Cys Ser His Leu Glu Cys Arg Thr Phe Phe
 AGCAAAGACA ATAGCATAAG GATTGGTTCC AAAGGGGACA TTTTGTTCAT AAGAGAACCA TTCATTTCAT GCTCTCATT GGAATGCAGA ACTTTTTTTC

NAV653 -----

NAV2H5 -----

NAV2D4 -----

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
 NAQC91 Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Arg His Ser Asn Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Lys Pro Ile Gly Glu Ala Pro
 TGACCCAAGG CGCTTTGCTG AATGACAGGC ATTCTAATGG AACCGTCAAG GACAGGAGTC CTTATAGAAC CTTAATGAGC TGCCCCATCG GTGAAGCTCC

NAV653 -----

NAV2H5 -----

NAV2D4 -----

	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
NAQC91	Ser Pro Tyr	Asn Ser Arg Phe	Glu Ser Val	Ala Trp Ser	Ala Ser Ala Cys His Asp Gly	Met Gly Trp	Leu Thr Ile Gly	Ile Ser Gly	Pro Asp Asn	
	ATCTCCGTAT	AATTCAAGGT	TCGAATCAGT	TGCTTGGTCA	GCGAGTGCAT	GCCATGATGG	AATGGGATGG	CTAACAATCG	GGATCTCCGG	TCCAGATAAT

NAV653

NAV2H5

NAV2D4

	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
NAQC91	Gly Ala Val Ala Val Leu Lys	Tyr Asn Gly Ile Ile Thr Asp	Thr Ile Lys	Ser Trp Arg	Asn Lys Asn Ile Arg Thr Gln	Glu Ser Glu	Cys Val Cys			
	GGAGCAGTAG	CTGTTTTAAA	ATACAATGGT	ATAATAACAG	ATACAATAAA	AAGTTGGAGA	AACAAAATAT	TAAGAACACA	AGAGTCAGAA	TGTGTTTGTA

NAV653

NAV2H5

NAV2D4

	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
NAQC91	Ile Asn Gly Ser Cys Phe Thr	Val Met Thr Asp Gly Pro Ser	Asn Glu Gln	Ala Ser Tyr Lys	Ile Phe Lys Met Glu Lys	Gly Lys Ile Ile	Lys Ser Ile			
	TAAACGGTTC	ATGCTTTACT	GTAATGACTG	ATGGCCCAAG	CAATGAGCAA	GCCTCATACA	AAATATTCAA	AATGGAGAAA	GGGAAGATTA	TTAAGTCGAT

NAV653

NAV2H5

NAV2D4

273

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900
NAQC91 Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Thr Gly Lys Val Val Cys Val Cys Arg Asp Asn Trp His Ala Ser Asn
TGAGCTGGAT GCACCGAACT ACCATTATGA GGAATGCTCC TGTTATCCTG ATACAGGCAA AGTGGTGTGT GTTTGCAGAG ACAATTGGCA TGCTTCGAAC

Asp
G

NAV653

NAV2H5

NAV2D4

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000
NAQC91 Arg Pro Trp Val Ser Phe Asp Gln Asn Leu Asp Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe Gly Asp Asn Pro Arg Ser Asn Asp Gly Lys Gly Asn
CGACCATGGG TCTCTTCGATCAGAATCCT GACTATCAGA TAGGATACAT ATGCAGTGGG GTTTTCGGTG ATAACCCGCG TTCTAATGAT GGGAAAGGCA

NAV653

NAV2H5

NAV2D4

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
NAQC91 Cys Gly Pro Val Leu Ser Asn Gly Ala Asn Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Arg Tyr Gly Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Ile Ser Ser
ATTGTGGCCC AGTACTTTCT AATGGAGCAA ATGGAGTGAA AGGATTCTCA TTAGATATG GCAATGGTGT TTGGATAGGA AGAACTAAAA GTATCAGCTC

NAV653

NAV2H5

NAV2D4

	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
	Ser Thr Ile Trp Thr Ser Gly	Ser Ser Ile Ser Phe Cys Gly Val Asp Ser	Glu Thr Thr Ser	Trp Ser Trp	Pro Asp Gly Ala Asp Leu Pro	Phe Thr Ile				
NAOC91	GCACAATCTG	GACTAGTGGG	AGGAGGATTT	CTTCTGTGG	TGTGGACAGT	AAAACACAA	GCTGGTCATG	GCCAGACGGA	GCTGATCTGC	CATTCACCAT

NAV653 -----

NAV2H5 -----

NAV2D4 -----

	1410
	Asp Lys STOP
NAOC91	TGACAAGTAG

NAV653 -----

NAV2H5 -----

NAV2D4 -----

Figure 9 Résumé des variations dues aux sélections par anticorps monoclonaux

Les mutations ponctuelles associées aux AcMo sur la NA des virus variants V2H5 et V2D4 sont comparées pour les mêmes positions au virus révertant V3A3, témoin V653, parental SwQc91 et à l'autre virus porcin sauvage SwQc81. L'information provient des séquences NA des virus V653, V2H5, V2D4, et V3A3, obtenues suite au séquençage par la méthode des didéoxynucléotides (Sanger et al., 1977) sur séquenceur automatisé ALF (PharmaciaBiotech, Uppsala, Suède). Les amorces utilisées pour le séquençage étaient les deux oligonucléotides sens : UP (5'ccctatagtgagtcgtatta3') et F (688-706)(ttaagaacacaagagt), tandis que les deux oligonucléotides anti-sens utilisés étaient les RP(5'caggaacagctatgac3') et R(735-752)(ctttactgtaatgactg). Le séquençage de chaque gène a été effectué sur trois différentes colonies bactériennes INV α F' recombinantes ayant le gène NA dans le plasmide PCR2.1™(InVitroGenCo, SanDiego,CA,USA). L'information des séquences de NA des virus sauvages SwQc91 et SwQc81 a été obtenue du GenBank (U86144 et U86145).

Position nucléotidique	1	817	1158	1410
Résidu d'acide aminé	1	273	386	470
NAV653		AAC	AGT	
		Asn	Ser	
NAV2H5		GAC	AGT	
		Asp	Ser	
NAV2D4		AAC	AGG	
		Asn	Arg	
NAV3A3		AAC	AGT	
		Asn	Ser	
NASwQc91		AAC	AGT	
		Asn	Ser	
NaSwQc81		AAT	AGT	
		Asn	Ser	

5 DISCUSSION

Sur le tableau I concernant la purification de l'antigène viral A/Sw/Quebec/5393/91, nous avons constaté que le rendement en titres HA se comparait avantageusement à d'autres rendements de purifications virales effectuées par notre laboratoire (Arora et al, 1985), toutefois le nombre de HA/mg du virus purifié est plus bas que ces mêmes autres purifications. En effet, nous avons récupéré 77 % de l'activité hémagglutinante contre 47 à 71 %, et avons obtenu $58,8 \times 10^3$ HA/mg contre 105 à 241×10^3 HA/mg.

D'après les résultats passés de purifications de virus par la même méthode, nous avons constaté que plus le volume initial de liquide allantoïque infectieux était grand et plus le rendement en HA/mg semblait être faible. Comme nous sommes partis de 5 L initial, ce qui est un volume beaucoup plus gros que pour les autres purifications auxquelles nous nous comparons (60 mL) ad-hoc, il va de soi que le rendement HA/mg soit encore plus bas. De plus, pour un tel volume initial, la méthode doit s'étaler sur deux jours ce qui doit probablement affaiblir l'activité HA du virus influenza porcin, lequel pourrait être plus instables que les autres virus humains autrefois purifiés dans notre laboratoire.

D'après le tableau II, nous n'avons purifié que 112 μ g des 343 μ g que théoriquement nous aurions dû obtenir, c'est-à-dire 33 % de la neuraminidase. Ainsi la neuraminidase purifiée ne représente que 2,3 % contre 7 % de ce qu'elle aurait dû être selon Bucher et Palese (1975). Notons toutefois que contrairement à ce qui était cru en 1975, les pourcentages de répartition des spicules HA et NA varient selon la souche, le type et le sous-type de spicule. De plus les virus cités le plus souvent de la littérature sont des virus infectant les humains, tandis que nous travaillons avec un virus typiquement porcin. Il n'existe pas à ce jour d'estimation du pourcentage réel de NA en surface des virus H1N1 porcins. Bien que difficile à quantifier avec une plus grande précision, il demeure toutefois vraisemblable que nous n'avons pas récupéré la totalité de la neuraminidase, puisque même les estimés les plus bas de pourcentages pondéraux de la NA, sont à 5 % du poids total viral, et nous avons récupéré 2,3 % du poids total protéique viral. Le défi consiste toutefois à vérifier l'état de cette NA purifiée quant à son antigénicité et cela a été démontré par test INA sur le sérum hyperimmun murin (voir figure 3).

Après fusion cellulaire entre splénocytes des souris immunes et cellules de myélomes, les surnageants d'hybridomes ont été criblés par test ELISA utilisant le virus SwQc91 comme antigène. 16 % des hybridomes obtenus sécrétaient des AcMo dirigés contre le virus

SwQc91, corroborant davantage l'immunogénicité de notre NA et la reproductibilité de la méthode de Cuatrecasas (1973) avec de la NA de virus influenza porcine. De 40 puits positifs pour l'une des fusions, 17 ont été trouvés positifs au test INA (résultats équivalents pour l'autre fusion effectuée par le laboratoire de Dr Arora), ce qui équivaut à dire qu'au moins 43 % des AcMo dirigés contre le virus SwQc91 l'étaient contre la partie globulaire de la molécule de neuraminidase. C'est en effet là que se trouvent les sites actifs inhibés par encombrement stérique lors des tests INA. Ceci étant dit, tenant compte des AcMo dirigés contre la NA sans nécessairement l'inhiber, cela signifie que le pourcentage des surnageants anti-NA_{SwQc91} était encore plus élevé que 43 %. Nous avons remarqué aussi qu'aucun des surnageants n'offrait de résultat IHA totalement nul lorsqu'essayé contre le virus SwQc91, mais que les AcMo anti-NA montraient toujours un titre IHA minimum de 4. Cette activité IHA résiduelle démontrait une activité croisée contre les molécules HA, qui s'exerçait probablement par encombrement stérique sur les HA entourant les molécules neuraminidasiques. Ce phénomène a maintes fois été rapporté et ne pose aucun doute sur la spécificité pour la NA de nos AcMo (Webster et al, 1982 ; Kilbourne et al, 1968). Ces résultats IHA, nous ont beaucoup influencé quant à la sélection des hybridomes tel que vu au tableau III, puisque nous voulions avoir des AcMo strictement dirigés contre la neuraminidase afin d'obtenir des outils de dépistage strictement basés sur la NA du virus influenza porcine. Les surnageants 2H5 et 3A3 nous ont intéressés de par leurs spécificités au virus SwQc91 en test ELISA et de par leurs fortes activités INA. Quant au surnageant 2D4, malgré une activité INA moyenne de 53 % son intérêt était surtout lié à sa forte affinité en test ELISA. De plus nous voulions développer un AcMo capable de reconnaître plusieurs virus porcins, dont SwQc81.

Un autre aspect des criblages était le nombre plutôt restreint d'AcMo anti-NA spécifiques de souche. En ELISA seulement deux des surnageants (2H5 et 3A3) de culture d'hybridomes sur les 35 capables d'inhiber l'activité NA du virus SwQc91, ont pu être reconnus spécifiques de souches. Cette observation démontre qu'il n'y a pas une grande variation antigénique au sein de la NA du virus influenza porcine entre SwQc81 et SwQc91, et confirme la proximité des gènes dans l'arbre phylogénétique de la même protéine (Arora et al., 1997b).

Suite à la préparation du fluide d'ascite avec les hybridomes sélectionnés, étalés et clonés, nous avons reconfirmé leur identité en les testant par ELISA sur les virus SwQc91 et SwQc81, aussi par INA sur les virus SwQc91, SwQc81 et SwKlop, trois différents virus influenza porcins du Québec. Tel que vu au tableau IV, les hybridomes ont gardé leurs caractéristiques confirmant la réussite des étalements, clonages et fabrication de fluides

d'ascite. Les valeurs obtenues pour les surnageants de culture d'hybridomes et les valeurs obtenues en utilisant une dilution 1/1000 du fluide d'ascite sont très similaires. L'AcMo 2H5 s'est révélé spécifique au virus SwQc91 autant aux tests ELISA qu'au test INA. Cela malgré de très faibles réactions de 8% et 5% d' INA contre les virus SwQc81 et SwKlop respectivement, lesquelles sont plus élevées que le bruit de fond d'une réaction sans anticorps. Cette dernière constatation laisse croire à une légère affinité croisée, mais pas assez pour classer l'AcMo 2H5 comme non-spécifique. L'AcMo 2D4 reconnaît les trois virus porcins déjà mentionnés au test INA de façon semblable, il est donc définitivement non-spécifique. C'est l'anticorps 3A3 qui nous a surpris le plus en offrant une réaction spécifique au test ELISA pour le virus SwQc91, mais lorsque testé en INA l'anticorps n'était plus aucunement spécifique et reconnaissait les trois virus porcins de façon presque équivalente. Ce qui est certain, c'est que 3A3 reconnaît le virus SwQc81 dans les conditions du test INA et ne reconnaît pas ce virus en conditions de test ELISA. Il est possible que le virus adsorbé au fond des puits des plateaux ELISA en poly-lysine activé soit déformé de façon à rendre l'épitope inapte à réagir avec l'anticorps. La présence de détergent Tween-20 au sein des solutions ELISA, pourrait également avoir été l'agent causal d'une non reconnaissance de l'épitope 3A3 sur SwQc81. Ces hypothèses sont d'autant plus plausibles puisque même pour le virus SwQc91 le résultat ELISA est plutôt faible.

En observant les résultats ayant trait au virus SwQc91, nous avons remarqué une relation inversement proportionnelle entre les résultats ELISA et INA. C'est-à-dire que plus l'activité INA est forte, plus faible semble être le résultat ELISA. Sachant que l'inhibition de l'activité neuraminidase est d'autant plus forte lorsque l'AcMo agit près du site actif, une topographie peut être esquissée (figure 10), avec un site 3A3 à proximité du site actif, un site 2D4 distant du site actif et un site 2H5 entre ces deux sites. La raison pour laquelle le résultat ELISA baisse à mesure que l'on s'approche du site actif, pourrait s'expliquer par le fait que le site actif se trouve dans une crevasse au centre d'un anneau surplombant le site actif (Colman et al, 1983), où l'accès est difficile pour les anticorps.

D'après les bandes de précipitations de la figure 4, l'anticorps 2H5 était un IgG2a, et l'anticorps 2D4 était un IgG2b, tous deux à chaînes légères κ . Ces précipitations montrent aussi que l'anticorps 3A3 est d'isotype IgG1 à chaînes légères λ . Bien que n'ayant pas testé d'anti- λ , l'anticorps 3A3 n'ayant pas réagi avec l'anti- κ était donc par défaut constitué de chaînes légères λ puisque 'il n'existe pas d'autre isotype de chaîne légère chez les anticorps murins. Les trois AcMo sont donc des IgG possédant des chaînes lourdes de type γ . Ces anticorps sont ceux qui en majorité se retrouvent dans le système sanguin. Tel qu'attendu

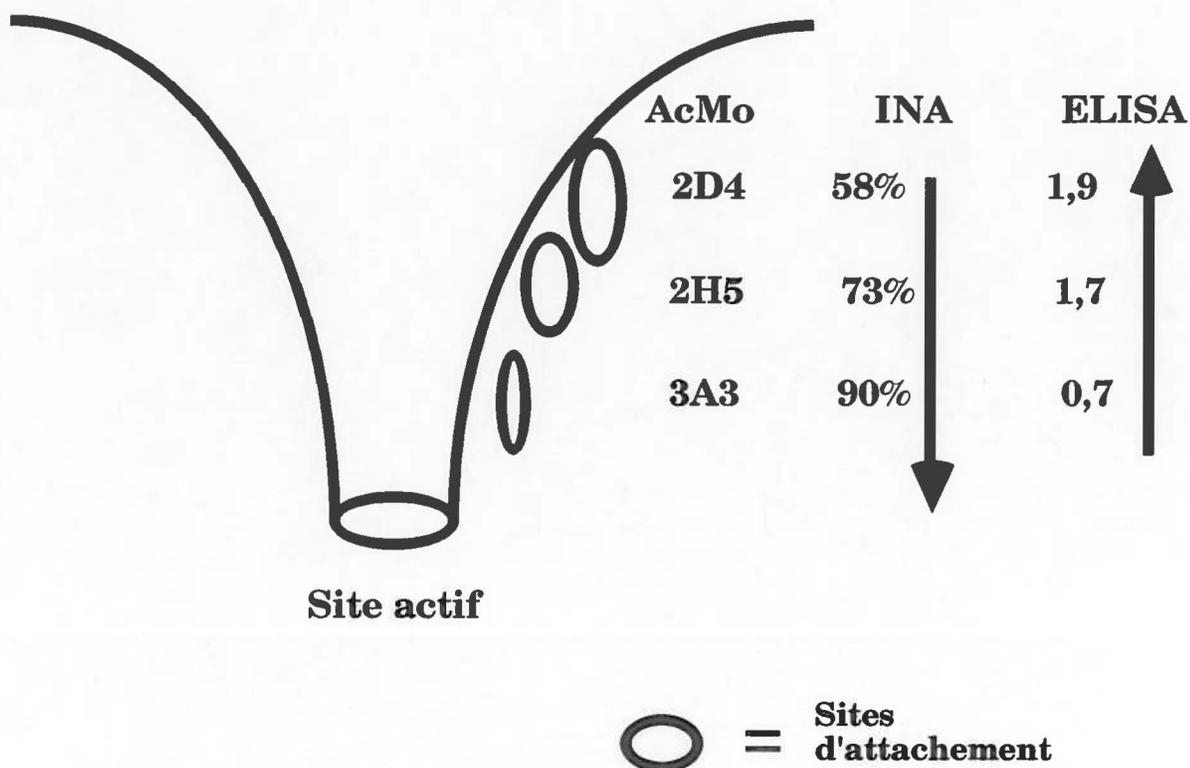


Figure 10 Topographie des sites de fixations des anticorps monoclonaux anti-NA

Proposition schématique des sites d'attachement des anticorps monoclonaux anti-NASwQc91, tels que définis par les test biochimiques; INA,ELISA, et compétitions en RIA.

nous n'avons pas trouvé d'anticorps IgM, typiques des réponses immunes primaires, ce qui est loin d'être le cas avec nos quatre rappels antigéniques de NA au cours du processus d'immunisation. L'AcMo 3A3 appartient à la sous-population d'anticorps ayant des chaînes légères λ représentant 5 % des anticorps sériques murins, tandis que 95 % des anticorps possèdent des chaînes légères κ (Roitt et al, 1989).

La figure 5a, montrant comment les AcMo 2D4 et 3A3, compétitionnaient avec l'AcMo marqué 2H5, nous a permis d'affirmer deux choses. D'abord, malgré quelques fluctuations aux fortes dilutions d'anticorps, les courbes montraient nettement une tendance indiquée par une droite passant par la pente des courbes. Les pentes des AcMo 2D4 et 3A3 étaient très semblables et distinctes de 2H5, car beaucoup moins prononcées. Toutefois, 2D4 et 3A3 semblaient légèrement compétitionner l'AcMo 2H5, puisque leurs pentes de compétition n'étaient pas nulles. En figure 5b, montrant comment l'AcMo 2H5 et 3A3 compétitionnaient l'AcMo 2D4, il en ressortait que 3A3 compétitionnait beaucoup mieux que 2H5. Cela montrait encore que 2D4 et 3A3 ont probablement des sites d'attachement plus près l'un de l'autre que pour 2H5. 2H5 compétitionnait néanmoins puisque sa pente n'était pas nulle. La pente de 2H5 en figure 5b étant plus prononcée que la pente de 2D4 et 3A3 en 5a, montrait que l'affinité de 2H5 pour son site d'attachement, était plus forte que pour les deux autres anticorps. En figure 5c montrant les courbes de compétition exercées par 2D4 et 2H5 sur 3A3 marqué, nous observons encore une fois des courbes semblables pour 2D4 et 3A3. Toutefois dans cette expérience, 2H5 semblait compétitionner tout autant sinon plus, si l'on se fie à l'allure de sa courbe. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une faible affinité de 3A3 pour son site d'attachement et une très forte affinité de 2H5 pour le sien situé à une distance proche l'un de l'autre. Pourquoi alors 3A3 compétitionnait si bien avec l'anticorps 2D4 en figure 5b? Tout cela devient cohérent si l'on accepte que les sites d'attachement de 2D4 et 3A3 sont très proches et peut-être même semblables, puisqu'identiques en courbes de compétitions dans toutes les expériences. Par contre, ceux-ci sont assez rapprochés, mais distincts du site d'attachement de 2H5. Il est difficile d'admettre, à prime abord, que 2D4 et 3A3 aient le même site d'attachement puisque les résultats en tests INA et en ELISA sont différents. Or, les isotypes étant différents pour 2D4 ($\gamma 2b_2\kappa_2$) et 3A3 ($\gamma 1_2\lambda_2$), cela pourrait expliquer les différences en tests biochimiques, sans pour autant conclure puisque des sites situés très près l'un de l'autre peuvent sembler identiques sans toutefois l'être vraiment (Webster et al., 1984). Une autre piste à ne pas négliger est celle de l'utilisation du BSA 1% comme agent bloquant. En effet cet agent bloquant rend les anticorps un peu plus collants inhibant ainsi leur spécificité. Dans le cas de faibles signaux le résultat peut se traduire en

des courbes montrant de fausses spécificités, l'utilisation de lait en poudre 1% serait peut être un atout dans de genre de test de compétition.

Lorsque nous avons infecté des oeufs avec 50 HA de virus SwQC91 en contact avec des quantités équivalentes de fluides d'ascite 2H5, 2D4 et 3A3, une certaine inhibition de l'infection a été obtenue. En effet, seulement 30 % des oeufs infectés avec le mélange virus et AcMo 2H5 ont résulté en infections détectables au test HA, donc 70 % des infections ont été neutralisées. Lorsque nous avons utilisé l'AcMo 2D4, 90 % des oeufs ont résulté en infections détectables au test HA, nous avons donc eu 10 % de neutralisation. Pour l'AcMo 3A3, c'est 70 % des oeufs qui ont résulté en infection, donc 30 % de neutralisation. Suite aux résultats de nos expériences, il apparaît que le pouvoir neutralisant des AcMo 2H5, 2D4 et 3A3, peut être classé en ordre croissant; 2H5 (70 %), 3A3 (30 %), et 2D4 (10 %). Tel que rapporté par des chercheurs ayant travaillé sur l'hémagglutinine (Haaheim et al, 1980; Russel et al, 1979), les anticorps monoclonaux spécifiques sont plus neutralisants que les anticorps monoclonaux ayant des réactions croisées avec les autres souches. Le même phénomène est vu ici avec des anti-NA spécifiques plus neutralisants que des anti-NA non spécifiques. De plus, ces différents pourcentages de neutralisation pourraient refléter l'importance respective des épitopes de chacun de ces anticorps pour l'accomplissement du cycle de multiplication viral. Toutefois, les fluides d'ascite peuvent varier de 5 à 10 µg/ml (Harlow et Lane, 1988), et cette plage de concentration peut peut-être jouer dans la force de neutralisation. Si nous prenons pour acquis que les anticorps étaient en excès dans tous les cas, ce qui devrait être le cas puisque nous avons utilisé du fluide d'ascite pur non-dilué, cette dernière variation devrait être écartée et les résultats montrer une réelle échelle des pouvoirs neutralisants. La toxicité du fluide d'ascite a été testée avec des oeufs infectés conjointement à du fluide d'ascite fait de myélomes ne sécrétant aucun anticorps et n'a révélé aucune perte d'infectivité dans les oeufs. Ces résultats démontrent aussi que les sous-populations virales mutent plus fréquemment aux épitopes 2D4, 3A3 et 2H5, respectivement, puisque pour contrecarrer une neutralisation par AcMo il doit y avoir, dans la soupe virale, des variants antigéniques mutés pour l'épitope reconnu par l'anticorps. En principe on peut déjà dire à cette étape qu'aucun de ces anticorps n'est dirigé contre le site actif, primordial au cycle de multiplication, puisque dans un tel cas nous aurions obtenu 100 % de neutralisation, entre autres parce que ce genre de site est en général extrêmement conservé et n'offre pas de sous-populations de variants antigéniques pour des sites actifs. De plus, non seulement pour 2D4 il y a plus d'oeufs ayant supporté des infections, mais les titres HA du virus y ayant poussé sont plus élevés, signe d'un pouvoir neutralisant faible de 2D4. Tandis que pour 2H5, les titres HA des virus résultants ne montaient jamais au-dessus de 64 HA.

L'identification des virus variants a été faite avec des tests INA démontrant l'incapacité des AcMo de sélection, d'inhiber l'activité neuraminidasique du virus échappant la neutralisation. Comme il est possible de constater aux colonnes V et IX du tableau V, seulement un des trois variants 2H5 a subi une réversion au type parental, démontré par une activité INA (92 %) égale, voire supérieure à celle obtenue avec le virus parental (80 %). Deux des variants 2H5 ont été confirmés dans leur identité de variants antigéniques de par leur sensibilité à l'activité INA de l'AcMo beaucoup plus faible que pour le virus parental. Un d'entre eux (V2H5/6) a pu être cloné en feuillettes de cellules MDCK, et confirmé comme variant antigénique de nouveau avec un titre INA de 0 % contre 80 % pour le virus parental. Le fait que nous ayons abaissé le titre INA de ce variant de 27 % après le clonage en oeufs, à 0 % après le clonage en cellules MDCK, montre que le virus n'était peut-être pas tout à fait cloné lors du clonage en oeufs. Notre témoin parental a prouvé encore que le seul passage en cellules proprement dit n'était pas responsable de cette chute d'activité INA. Tel que pour le variant 2H5/6, le variant 2D4/1 a été reconfirmé comme variant antigénique après les clonages en cellules MDCK. Finalement, contrairement aux deux autres variants (V2H5/6 et V2D4/1), les variants antigéniques V3A3 obtenus après les clonages en oeufs, n'ont jamais pu être clonés en feuillettes de cellules MDCK. Le virus V3A3 ne poussait littéralement pas en feuillettes MDCK. Des seules trois plages obtenues, deux se sont trouvées être des particules non-infectieuses et l'autre (V3A3/31) une particule ayant subi une réversion parentale, lui conférant le même titre INA que le virus parental (100 %).

Lorsque nous avons analysé les séquences nucléotidiques des gènes NA des virus variants V653/21, V2D4/1, V2H5/6 et V3A3/31 (figure8), que nous les avons comparées avec la séquence NASwQc91 publiée dans le GenBank (Arora et al.,1997), nous avons noté trois principales observations. Premièrement, il y avait des variations dues aux passages, deuxièmement des variations dues aux anticorps, et troisièmement une réversion au génome parental. Pour conclure aux mutations dues aux passages, nous avons comparé la séquence de V653/21, un témoin consistant d'un virus parental ayant subi les mêmes traitements que les virus variants, avec la séquence de NASwQc91 déjà publiée. Rappelons que les traitements incluait une mise en contact du virus témoin avec du fluide d'ascite sans AcMo et les mêmes passages en oeufs et en cellules MDCK. Quatre variations nucléotidiques en positions 55, 110, 123, et 1175 ont été observées, dont deux d'entre elles résultaient toujours en des mutations non-silencieuses, c'est-à-dire un remplacement d'un AA par un autre. Comme la caractéristique principale des cellules de myélomes utilisées (P3XAg8.653) (Kearney, 1979) était, d'être incapable de produire toute chaîne légère et lourde

contrairement à d'autres myélomes autrefois utilisés, nous pouvons alors affirmer que ce ne sont pas des AcMo contenus dans le fluide d'ascite fait de myélomes qui ont sélectionné au sein du virus témoin. Bien entendu le fait d'injecter du pristane et des myélomes au sein d'une souris, crée un état inflammatoire local perméable aux molécules sanguines tels les anticorps polyclonaux sériques. Toutefois les souris sont gnotobiotiques et n'ont jamais été exposées au virus influenza auparavant, ce qui rend la thèse d'une sélection par les anticorps sanguins difficile à soutenir. De plus, les pressions mutagéniques exercées par les cellules hôtes d'une infection sont bien connues. En général, ces mutations s'exercent dès les premiers passages dans leur hôte, et n'ont comme but, qu'une meilleure efficacité du cycle d'infection au sein des cellules. Bien que ce phénomène soit bien documenté pour la molécule de l'hémagglutinine, peu de chercheurs se sont attardés à une telle sélection de variants neuraminidiques par l'hôte uniquement (Robertson, 1993, 1995; Robertson et al., 1993; Ito et al., 1997; Vines et al, 1998). Néanmoins, la NA interagissant avec le même récepteur cellulaire que l'HA et ayant le même parcours intra-cellulaire, il va de soi que la NA est toute aussi sujette à une telle sélection.

Lorsque nous avons comparé les séquences nucléotidiques NA de V3A3 et V653, aucune différence n'a été observée. Cela a confirmé que le variant antigénique V3A3/31 titrant 5 % INA suite aux clonages en oeufs, a subi une réversion au type parental après les passages en cellules MDCK, suite auxquels le soi disant variant titrait 100 % INA tel le virus parental. Non seulement le virus a subi une réversion, mais des trois plages provenant de trois virus 3A3 essayés en clonages en cellules MDCK, deux se sont révélées être des particules non-infectieuses, voire des contaminants. Bien entendu l'idéal serait de séquencer V3A3 avant que la réversion ne se soit produite et ainsi confirmer la dite réversion. Malgré tout, ces résultats quoique préliminaires, laissent croire que tous les variants 3A3 étaient tout simplement incapables de pousser en cellules MDCK. Bien que des chercheurs aient déjà tenté d'établir un lien entre la composition génétique des virus et la morphologie de plages, aucune conclusion hors de tout doute n'a pu être établie (Oxford et al., 1982). Le site d'attachement de l'AcMo 3A3, jouerait-il un rôle majeur dans la croissance virale en cellules MDCK? Voilà une belle perspective qui pourrait aider à mieux comprendre la relation entre la composition génétique et la morphogénèse des plages de lyses.

Les variations nucléotidiques des variants V2H5 et V2D4, ont toutes deux résulté en une mutation non-silencieuse, rendant V2H5 et V2D4 différents de un AA par rapport à V653. En effet, pour la NA du virus V2H5, un aspartate (Asp) en position 273 remplace un AA asparagine (Asn), et au sein du virus V2D4, une arginine (Arg) en position 386 remplace

une sérine (Ser). Cela veut dire que, malgré le fait que les interactions épitopes/paratopes aient toujours été décrites comme très nombreuses, allant de 3 contacts à 16 contacts (Poljak,R., 1986), il existerait dans notre cas un contact stratégique qui lorsque muté de façon désavantageuse ne permettrait plus à l'AcMo spécifique d'adhérer. Cela bien entendu est vrai seulement si l'AA en question fait vraiment lui-même contact avec le paratope de l'anticorps. Nous avons toutefois noté que les AA mutés chez nos variants, pourraient être des AA liés à la glycosylation. Pour V2H5, la perte de Asn₂₇₃, signifie peut-être la perte d'une glycosylation N-liée et pour V2D4, la perte de Ser₃₈₆, pourrait signifier la perte d'une glycosylation O-liée. Dans de tels cas, une seule mutation de 1 AA pourrait entraîner la perte d'un complexe glycosidique au sein duquel seraient perdus tous les points de contacts du réel épitope liant le paratope des anticorps (Darnell et al. 1990). Cette dernière hypothèse est la plus plausible. Notons que le même genre de résultats de mutations a été obtenu par d'autres chercheurs ayant travaillé sur l'hémagglutinine du virus influenza (Luoh et al., 1992; Katz et Webster, 1992). Le contact stratégique mentionné plus haut pourrait être corroboré grâce à des études de mutagenèses dirigées afin de déterminer si en effet l'ajout ou le retrait d'un AA, pourrait reproduire le phénotype trouvé.

Les AA 273 et 386, semblent éloignés sur la séquence protéique linéaire. Toutefois, sur la conformation tri-dimensionnelle, les repliements intrinsèques aux feuillettes β -anti-parallèles, pourraient rapprocher les deux sites, du moins leurs glycosylations si tel est le cas, de sorte que les AcMo 2H5 et 2D4 offrent tout de même une certaine compétition entre eux en RIA. D'autre part, en tests de compétition les AcMo 2D4 et 3A3 ayant montré une similarité assez proche entre leurs compétitions, il va de soi que leurs sites d'attachement aux anticorps doivent être rapprochés. Comme l'AcMo 3A3 possède une activité INA de 90 % et de 2D4 58 %, il est probable que le site 3A3 se trouve entre le site 2D4 et le site actif. Ce qui expliquerait qu'il est plus apte à mieux inhiber l'activité neuraminidasique lorsque lié. Une distribution triangulaire des sites d'attachement 2D4, 2H5 et 3A3 est donc proposée suite aux résultats INA, ELISA, RIA et les séquençages des variants spécifiques V2H5 et V2D4. Toutefois un ELISA compétitif serait intéressant afin de corroborer les tests de compétitions et mieux établir les affinités respectives de chacun des AcMo. Cela d'autant plus que ces AcMo risquent de se retrouver dans des trousse diagnostiques de type ELISA en situation de compétition.

La structure tri-dimensionnelle de la NA de sous-type N1 n'a pas été cristallographiée à ce jour. D'autre part, selon les travaux de Concannon et collaborateurs (1984), les sites antigéniques de la NA sous-type N1 sont distribués de façon homologue à ceux décrits pour

les NA de sous-type N2. Néanmoins, une glycosylation covalente en Asn₂₀₀ sur la N2 couvrirait une grande partie des sites antigéniques rendant plusieurs AcMo anti-N1 inaccessibles aux sites antigéniques N2. Des observations similaires ont été vues pour les molécules HA de sous-type H1 et H3 (Caton et al., 1983). Ceci étant dit, la structure cristallographique 3-D de la NA de sous-type N2 peut donc être prise telle quelle pour situer physiquement les épitopes des AcMo 2H5 et 2D4 (figure 11).

Comme on peut le voir à la figure 9, bien que deux virus tels SwQc81 et SwQc91 aient le même AA en position 273 (Asn) de leur protéine NA, l'AcMo ne reconnaît que SwQc91, signifiant que 273 au sein de SwQc81 n'est pas présenté à la surface de la même façon qu'au sein du virus SwQc91. Les différences dans le reste de la séquence de NASwQc81 sont probablement responsables de l'interférence avec l'AcMo 2H5 à reconnaître SwQc81. Il n'est pas exclu que les deux différences de sites de glycosylations entre NASwQc81 et NASwQc91 mentionnées dans la revue de littérature (voir 2.3.5.2) soient impliquées dans ce dernier phénomène.

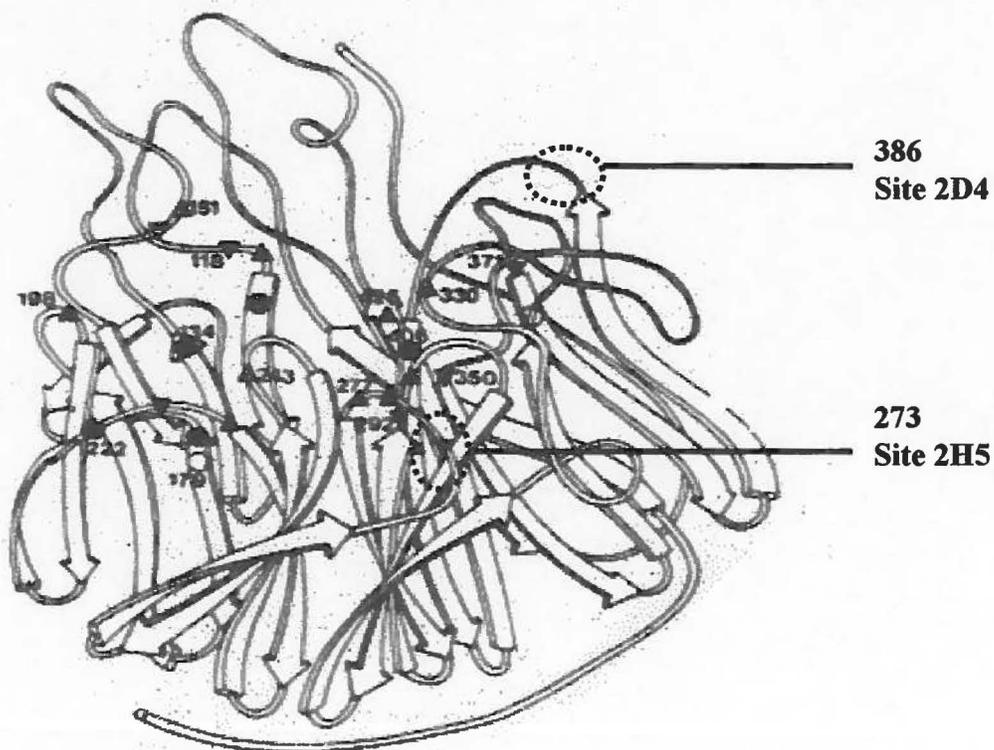


Figure 11 Structure du monomère de NA localisant les épitopes associés aux AcMo 2D4 et 2H5

Image tri-dimensionnelle du monomère de NA montrant les régions probables où se trouvent les épitopes associés aux AcMo 2D4 et 2H5. L'image montre en plus les sites conservés de la molécule tels que publiés dans le livre « The Influenza Viruses » (Krug, 1989). L'adaptation de cette figure a été rendue possible grâce à la courtoisie du Dr Peter Colman auteur original de cette figure.

(groupes : acides ▲, basiques ▼, hydrophobes ●, neutre ○)

6 CONCLUSION

Les précédentes études effectuées par notre laboratoire sur le virus influenza A/Sw/Qc/5393/91 avaient montré que l'HA avait varié en séquence nucléotidique, protéique, et en antigénicité, puisqu'un AcMo anti-HA (G9), avait permis un diagnostic différentiel du virus local à l'étude. Un séquençage de la NA nous avait démontré que cette protéine était également en variation, mais son évolution antigénique restait à être explorée.

C'est dans ce contexte d'exploration de l'antigénicité de la NA du virus A/Sw/Qc/5393/91, que nous avons produit dans un premier temps des AcMo spécifiques de la NA de ce virus. Dans un deuxième temps nous avons caractérisé ces molécules non seulement quant à leurs réactivités croisées via d'autres souches locales, mais aussi en tant que molécules, en typant ces immunoglobulines et en explorant leurs interactions stériques aux sites antigéniques d'attachement. Finalement, dans le but d'approfondir au maximum la caractérisation des AcMo anti-NA, nous avons étudié leurs pouvoirs neutralisants et/ou sélectifs, créé des variants spécifiques aux AcMo de l'étude, et identifié ainsi les épitopes au niveau du gène associé aux paratopes des immunoglobulines.

L'objectif premier de créer des AcMo inhibiteurs de l'activité neuraminidase reconnaissant strictement la NA a été atteint, puisque trois hybridomes sécrétaient des AcMo INA-positifs et IHA-négatifs. Toutefois ces AcMo; 2H5, 2D4, et 3A3, n'étaient pas identiques dans leurs spécificités de réactions envers les différentes souches locales d'influenza porcine testées. En effet, en test ELISA les AcMo 2H5 et 3A3 réagissaient spécifiquement au virus SwQc91 sans reconnaître SwQc81. Au test INA, seul l'AcMo 2H5 semble spécifique à la souche SwQc91, en ne reconnaissant pas les souches SwQc81, ni SwKlop. La caractérisation de ces anticorps montre qu'ils sont d'isotypes différents, mais que les sites d'attachements sont proches surtout entre 2D4 et 3A3. L'analyse des forces d'inhibition, des forces d'affinité et du pouvoir compétitif de chaque anticorps nous a permis d'établir une topographie relative des sites d'attachements des AcMo. Ces résultats ont alors complété notre objectif de caractérisation de nos anticorps.

Comme mentionné dans notre deuxième objectif, nous avons étudié l'effet des AcMo sur le virus SwQc91. Lorsque le virus a été cultivé en présence de concentrations saturantes d'AcMo 2H5, 2D4, et 3A3, des variants antigéniques identifiés par le test INA avec l'anticorps de sélection ont été obtenus. Toutefois les trois anticorps ont été capables de neutraliser les infections dans au moins un des oeufs incubés avec le virus parental

(SwQc91), signifiant qu'ils avaient un certain pouvoir neutralisant. Deux des variants, V2H5/6 et V2D4/1 ont été clonés avec succès en cellules MDCK puisque reconfirmés dans leurs identités de variants par test INA suite à ce procédé. Quant au variant V3A3/31, l'impossibilité de clonage en cellules MDCK, laisse croire que le site d'attachement de l'anticorps de sélection 3A3 pourrait être impliqué dans le processus de formation de plages virales sur cellules en agar. Pour compléter notre objectif d'associer des variations à des épitopes, nous avons comparé les séquences protéiques déduites des séquences nucléotidiques, des gènes NA des virus V653/1 (témoin traité sans AcMo) et du virus parental SwQc91 (GenBank). Cela a montré différentes mutations dues aux multiples passages dans les oeufs et feuillettes cellulaires MDCK. Deux des trois mutations non-silencieuses observées se retrouvaient chez tous les autres variants également (V2D4/1, V2H5/6 et V3A3/31), le changement en positions d'AA 19 d'une valine pour une isoleucine, et en 392 d'une glycine pour un acide aspartique, semblent être des mutations adaptatives du virus. C'est en comparant V653/1 avec V2D4/1 et V2H5/6 que nous avons identifié un seul acide aminé de divergence sur la séquence protéique. L'analyse des séquences nucléotidiques du gène NA de V2H5/6 nous montre qu'en position 273 un acide aspartique remplace une asparagine, et qu'au sein de la NA de V2D4 à la position 386, une arginine remplace une sérine. Ces informations permettent de localiser ces épitopes au sein de structures tri-dimensionnelles neuraminidasiques disponibles dans la littérature. Ainsi nous avons en passant par l'étude de l'effet des AcMo anti-NA sur l'infection virale, abouti à des variants antigéniques spécifiques à nos AcMo, nous ayant permis de caractériser d'avantage deux de nos anticorps jusqu'à la proposition d' épitopes au niveau du gène.

Ces travaux explorant l'antigénicité de NASwQc91 via l'étude d'AcMo anti-NA, ont démontré que son évolution par rapport à NASwQc81, était plutôt limitée malgré les précédents travaux d'analyse de séquences offrant 22 variations d'AA entre ces deux protéines. Nous avons également démontré que le comportement de la NA lorsque mise en présence d'AcMo anti-NA était identique au comportement des HA dans le même genre d'expérience répertorié dans la littérature. C'est-à-dire que les variants sélectionnés par AcMo n'offrent que très peu de variations, un AA la plupart du temps, par rapport au virus parental. Bien qu'en théorie il devrait exister des sous-populations ayant toutes sortes de mutations, ces sous-populations ne sont pas sélectionnées. Ainsi le virus influenza confirme que dans sa stratégies de mutations afin de « survivre », ce ne sont pas toutes les mutations ponctuelles lui procurant une nouvelle composition protéique qui sont gardées, mais bien la composition optimale d'infektivité ayant le moins de mutations « forcées » possibles. Il s'agit donc bien d'une « adaptation » du virus. Bien entendu ce phénomène doit être le même in-

vivo dans les élevages de porcs ou le virus sauvage doit contrecarrer les anticorps du système immunitaire porcin afin de se multiplier. L' évolution antigénique plutôt limitée de la NA de sous-type N1 entre la souche issue des épidémies des années quatre-vingt (SwQC81) et la souche issue des épidémies des années quatre vingt dix (SwQ91) pourrait s'expliquer par la faible durée de vie des porcs versus celle des humains pouvant offrir une bien meilleure pression immunitaire sélective. En effet chez le porc le virus passe rapidement d'un hôte infecté de courte vie vers des hôtes n'ayant aucune immunité, tandis que chez la population humaine le virus passe le plus souvent d'un hôte à longue vie vers d'autres humains ayant déjà rencontré du virus auparavant.

Les résultats de ces travaux qui incluent la production d'AcMo anti-NASwQc91 caractérisés selon une dimension intrinsèque (en tant qu'Ig) et extrinsèque (épitopes), offrent de trop nombreuses perspectives pour une énumération exhaustive. Toutefois, parmi les applications possibles : les AcMo 2H5 et 3A3 seraient en mesure d'offrir un diagnostic différentiel suite au développement de trousse diagnostic ELISA, et l'AcMo 2D4 pourrait servir à diagnostiquer les deux principales souches d'influenza porcines québécoises, et cela basé strictement sur la NA sans égard pour l'HA. Ceci pourrait être particulièrement intéressant dans le cas de l'émergence d'un virus qui aurait perdu son gène HA au profit d'un autre qui serait inconnu. Ces anticorps peuvent également servir dans plusieurs autres tests et techniques de laboratoire dont notamment en immunobuvardages et en immunoprécipitations. Un usage thérapeutique envisageable surtout pour les populations humaines n'est pas non plus à négliger. En effet, en prophylaxie ces AcMo pourraient aussi servir aux côtés d'anti-HA pour amenuiser l'infection chez des éleveurs de porcs ayant contracté un virus porcin, comme cela a déjà été le cas ailleurs dans le monde dont au Etats-Unis voisin.

REMERCIEMENTS

1) Je remercie mon directeur de recherche le Dr. Jit S. Arora de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir guidé au cours de mes travaux.

2) Je remercie les organismes subventionnaires suivants d'avoir contribué à la réalisation de mon projet de recherche;

-Biovet Diagnostic Inc.

-Conseil de Recherche en Pêcheries et Agro-alimentaire du Québec (CORPAQ)

-Fondation Armand-Frappier ; "Bourse Pharmaprix 1996"

3) Je remercie également le personnel technique suivant pour son aide substantielle;

-Marc Henrichon au laboratoire de Dr Arora

- Denise Cloutier au Service de Culture Cellulaire

-Lise Forget et Louise Paris au Service de Séquençage

-Michel Boivins au Centre de Biologie Expérimentale

BIBLIOGRAPHIE

- Ada, G.L. et Perry B.T. 1954. The nucleic acid content of influenza virus. *Aust.J. Exp. Biol. Med. Sci.* **32**: 453-467
- Air, G.M., Laver, W.G. 1981. Mechanism of antigenic drift in influenza virus. *Mol. Biol.* **145**: 339-361
- Air, G.M., Els, M.C., Brown, L.E., Laver, W.G., Webster, R.G. 1985. Location of antigenic sites on the three dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. *Virology* **145**: 237-248
- Air, G.M., Laver, W.G., Webster, R.G. 1987. Antigenic variations in influenza viruses. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **8**:20-59
- Air, G., Laver, W.G. 1989. The neuraminidase of influenza virus. *Proteins Struct. Function Genet.* **6** :341-356
- Archetti, I., Horsfall, F.L. 1950. Persistent antigenic variation of influenza A viruses after incomplete neutralization in ovo with heterologous immune serum. *J.Exp.Med.* **92**: 441-446.
- Arora, D.J.S., 1979. Purified viral neuraminidase vaccine to control influenza. *Can. Medical Association J.* **121**: 1575-1579
- Arora, D.J.S., Hill-Schubert, J., Vincent C. 1980. The presence of two neuraminidases in an influenza virus. *Can. J. Microbiol.* **26** : 243-249
- Arora, D.J.S., Hill-Schubert, J. 1980. The complete neuraminidase of influenza A/PR/8/34 (H₀N₁) is not detectable in its recombinant virus. *Can. J. Microbiol.* **26** : 1369-1373
- Arora, D.J.S., Houde, M., Justewicz, D.M., Mandeville, R. 1984. In-vitro enhancement of human natural cell-mediated cytotoxicity by purified influenza virus glycoproteins. *J. Virol.* **52**: 839-845
- Arora, J.S., Tremblay, P., Bourgault, R., Boileau, S. 1985. Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid. *Anal. biochem.* **144**: 189-192
- Arora, D.J.S., Justewicz, D.M. 1986. Influenza viral glycoproteins induce cell-mediated cytotoxicity by an interferon-independant mechanism. *Cellular Immunol.* **97**:102-109
- Arora, D.J.S., Gabriel, L.F. 1986. Characterization of influenza virus neuraminidase with hemagglutinin activity and its comparison with that of viral neuraminidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **884**:73-83

- Arora, D.J.S., Justewicz, D.M. 1988. Human influenza viral neuraminidases augment cell-mediated cytotoxicity in-vitro. *Ntl. Immun. Cell Growth Regul.* 7:87-94
- Arora, D.J.S., Houde, M. 1991. Modulation of murine macrophage responses stimulated with influenza glycoproteins. *Can.Rev.Microbiol.* 38:188-192
- Arora, D.J.S., N'Diaye,M., 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., Henrichon,M. 1997b. Complete sequences of the neuraminidase genes of swine influenza viruses (H1N1) associated with the respiratory disease in pigs. *Virus Genes* 14: 251-254
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1989. Short protocols in molecular biology. Cappendium. John Wiley & Sons Inc., N-Y,USA.
- Aymard-henry, M., Coleman, M.T., Dowdle, W.R., Laver,W.G., Schild, G.C., Webster, R.G. 1973. Influenzavirus neuraminidase and neuraminidase-inhibition test procedures. *Bull.Org.mond. Santé* 48:199-202
- Aymard, M., Brigaud, M., Chastel,C., Fontaine,M., Tillon, J.P., Vannier,P. 1980.Comparaison de l'immunité sérique anti influenza A de diverses populations humaines et de porcs. *Comp. Immun. Microbiol. infect. Dis.* 3: 111-119
- Braam, J., Ulmanen, I., Krug, R.M. 1983. Molecular model of eukaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell* 34: 609-618.
- Brès, P. 1980. Surveillance épidémiologique des gripes humaines dans le monde. Le programme de l'OMS. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 3, pp33-43
- Brown, I.H., Manvell, R.J., Alexander. D.J., Chakraverty, P., Hinshaw, V.S., Webster, R.G. 1993. Swine influenza outbreaks in England due to a new H1N1 virus. *Veterinary Record.* 132: 461-462
- Bucher, D.J., Palese, P. 1975. The biologically active proteins of influenza virus. Neuraminidase, in : *Influenza virus and Influenza*, (E.D. Kilbourne, ed.), Academic, New-York, USA, 83-123
- Burnet, F.M. 1948. The mucinase of *V.cholerae*. *Aust.J.exp.Biol.med.Sci.* 26: 381-387
- Caton, A.J., Brownlee,G.G., Yewdell, J.W., Gerhard, W. 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31: 417-427

- Centers for Disease Control. 1982. Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance. US Department of health and human services/ Public Health Service. **B:7-44**
- Chomczynski, P., et Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**: 156-159
- Choppin, P.W., Murphy, J.S., Stoecknius, W. 1961. The surface structure of influenza virus filaments, *Virology* **13**:548-550
- Claas, E.C.J., Kawaoka, Y., DeJong, J.C., Masurel, N., Webster, R.G. 1994. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* **204**: 453-457.
- Colman, P.M., Varghese, J.N., 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 neuramidase. *Curr. Top. microbiol. immun.* **114**: 117-255
- Colman, P.M. 1989. Neuraminidase Enzyme and Antigen. *The Influenza Virus*. Edited by Robert Krug. Plenum Press. Chap. 4 :175-217
- Concannon, P., Kwolek, C.J., Salser, W.A. 1984. Nucleotide sequence of the influenza virus A/USSR/90/77 neuraminidase gene. *J. Virol.* **50**: 654-656
- Conseil canadien du porc. Atelier national sur la recherche porcine, et le transfert de technologie, Ottawa, 12 et 13 janvier 1996, section 7, pp1-6
- Corfield, A.P., Lambré, C.R., Michalski, J.-C., Schauer, R. 1992. In: Conference P.Laudat (INSERM, Ed), Paris, France, pp111-175
- Cuatrecasas, P. 1973. Purification of neuraminidases (sialidases) by affinity chromatography. *Methods in Enzymology* **38B**: 897-902
- Current protocols in immunology. Yokohama, W., M. 1991. Production of Monoclonal Antibodies. John Wiley & Sons Inc., N-Y, USA.
- Daniels, R.S., Douglas, A.R., Skehel, J.J., Wiley, D.C. 1983. Analyses of the antigenicity of influenza Haemagglutinin at the pH optimum for virus-mediated membrane fusion. *J.Gen.Virol.* **64** : 1657-1662
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. 1990. *Molecular Cell Biology*. Plasma-membrane, secretory, and lysosome proteins: Biosynthesis and sorting. Chapitre 17, pp639-680.

- Davey, J., Dimmock, N.J., Colman, A. 1985. Identification of the sequence responsible for the nuclear accumulation of the influenza virus nucleoprotein in *Xenopus* oocytes. *Cell* **40**: 667-675
- Dea, S., Bilodeau, R., Sauvageu, R., Montpetit, C., Martineau, G.P. 1992. Antigenic variant of swine influenza virus causing proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. *J. Vet Diagn. Invest.* **4**: 380-392.
- Drzeniek, R. 1972. Viral and bacterial neuraminidases. *Curr. Top. microbiol. Immun.* **59**: 35-74
- Elford, W.J., Andrewes, C.H., Tang, F.F. 1936. The size of the viruses of human and swine influenza as determined by ultrafiltration. *Brit. J. Exp. Pathol.*, **17**: 51-53
- Elleman, T.C., Azad, A.A., Ward, C.W. 1982. Neuraminidase gene from the early Asian strain of human influenza virus A/RI/5/57 (H2N2). *Nucleic acids res.* **10**: 7005-7015
- Fields, B.N. 1990. *Virology*, second Edition, ed. N. Fields, D.M. Knipe et al. Raven, Press, Ltd.. Chapitre **38**
- Fields, B.N. 1996. *Virology*, third edition, Lippincott-Raven Publishers.
- Frish-Niggemeyer, N., Hoyle, L. 1956. The nucleic acid and carbohydrate content of influenza virus A and of virus fractions produced by ether disintegration. *J. Hyg.*, **54**: 201-212
- Frommhagen, L.H., Knight, C.A., Freeman, N., K. 1959. The ribonucleic acid, lipid and polysaccharide constituents of influenza virus preparations. *Virology* **8**: 176-197
- Gerhard, W., Webster, R.G. 1978. Antigenic drift in influenza A viruses I. Selection and characterization of antigenic variants of A/PR/8/34 [H0N1] Influenza virus with monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* **148**: 383-392
- Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E. 1981. Antigenic structure of influenza virus haemagglutini defined by hybridoma antibodies. *Nature.* **290** : 713-717
- Haaheim, L.R., Schild, G.C. 1976. Antigenic variants influenza A virus obtained in vitro. *Bull. W.H.O.* **53**: 305-311
- Haaheim, L.R., and Schild, G.C. 1980. Antibodies to the strain-specific and cross-reactive determinants of the hemagglutinin of influenza H₃N₂ viruses: Antiviral activities of the antibodies in biological systems. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B Microbiol.* **88(6)**: 335-340

- Hannoun, C. 1980. Rappel sur le virus de la grippe. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **3**:1-4
- Hardy, C.T., Young, S.A., Webster, R.G., Naeve, C.W., Owens, R.J. 1995. Egg fluids and cells of the chorioallantoic membrane of embryonated chicken eggs can select different variants of influenza A(H3N2) Viruses. *Virology*. **211**: 302-306.
- Harlow, E., Lane, D., *Antibodies; A laboratory manual*. 1988. Cold Spring Harbor Ed. Chapter 6: 139-244, 9:330-331
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., Smith, M.H. 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* **4**: 3021-3024
- Hinshaw, V.S., Alexander, D.J., Aymard, M., Bachmann, P.A., Easterday, B.C., Hannoun, C., Kida, H., Lipkind, M., Mackenzie, J.S. 1984. Antigenic comparisons of swine-influenza-like H1N1 isolates from pigs, birds and humans: an international collaborative study. *Bull. World Health Org.* **62**: 871-881
- Hirst, G.K. 1973. Mechanism of influenza virus recombination. I. Factors influencing recombination rate between temperature sensitive mutants or strain WSN and classification of mutants into complementation- recombination groups. *Virology* **55**: 81-93
- Inglis, S.C., Carroll, A.R., Lamb, R.A., Mahy, B.W.J. 1976. Polypeptides specified by the influenza virus genome. 1. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology* **74**:489-503
- Inglis, S.C., Bauet, T., Brown, C.M., Almond, J. 1979. The smallest genome RNA segment of influenza virus contains 2 genes that may over-lap. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**: 3790-3794
- Ito, T., Nelson, J., Couceiro, S.S., Kelm, S., Baum, L.G., Krauss, S., Castrucci, M.R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J.C., Webster, R.G., Kawaoka, Y. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* **72**: 7367-7373.
- Itztein, M.V., Wu, W.-Y., Kok, G.B., Pegg, M.S., Dyason, J.C., Jin, B., Phan, T.V., Smythe, M.L., White, H.F., Oliver, S.W., Colman, P.M., Varghese, J.N., Ryan, D.M., Woods, J.M., Bethell, R.C., Hotham, V.J., Cameron, J.M., Penn, C.R. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**: 418-423
- Joassin, L., Vincenzotto, C., Cloes, J.-M., Bouchet, M., Reginster, M. 1987. Monoclonal antibodies detect M-protein epitopes on the surface of influenza virions. *Arch. Virol* **95**: 183-195.

- Kaplan, M.M. 1980. Some epidemiological and virological relationships between human and animal influenza. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **3**: 19-24
- Katz, J.M., et Webster, R.G. 1992. Amino acid sequence identity between the HA1 of influenza A (H3N2) viruses grown in mammalian and primary chick kidney cells. *J. Gen. Virol.* **73**: 1159-1165
- Kearney, J.-F., et al. 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. of Immunol.* **123**: 1548-1550
- Kilbourne, E.D., Laver, W.G., Schulman, J.L., Webster, R.G. 1968. Antiviral activity of antiserum specific for an influenza virus neuraminidase. *J. Virol.* **2**: 281-288
- Klenk, H.-D., Rott, R. 1988. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. *Adv. Virus. Res.* **34**: 247-280
- Köhler, G., Milstein, C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497
- Krug, R.M., Etkin, P.R. 1973. Cytoplasmic and nuclear virus specific proteins in influenza virus infected MDCK cells. *Virology* **56**: 334-348.
- Krug, R.M., Soeiro, R. 1973. Studies on the intranuclear localization of influenza virus specific proteins. *Virology* **64** : 378-387.
- Kruger, N.J., et Hammond, B.W. 1987. Purification of immunoglobulins using Protein A-sepharose. *Methods in Molecular Biology-New Protein Techniques*. Ed. Walker, J.M. Humana Press. Clifton, New-Jersey. **3**: 363-371
- Krystal, M., Li, R., Lyles, D. Pavlakis, G., Palese P. 1986. Expression of the three influenza virus polymerase proteins in a single cell allows growth complementation of viral mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**; 2709-2713
- Lamb, R.A., Etkin, P.R., Choppin, P.W. 1978. Evidence for a ninth influenza viral polypeptide. *Virology* **91**:60-78
- Lamb, R.A., Choppin, P.W. 1979. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**: 4908-4912.
- 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 overlapping proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78** : 4170-4174
- Lamb, R.A., Choppin, P.W. 1983. Gene structure and replication of influenza virus *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 467-506

- Langmuir, A.D., Worthen, T.D., Solomon, J., Ray, C.G., Petersen, E. 1985. The Thucydides syndrome, a new hypothesis for the cause of the plague of Athens. *New Engl. J. Med.* **313**: 1027-1030
- Laver, W.G., Air, G.M., Webster, R.G. 1981. Mechanism of antigenic drift in influenza virus. Amino acid sequence changes in an antigenically active region of Hong-Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin. *J. Mol. Biol.* **145**: 339-361
- Lazarowitz, S.G., Compans, R.W., Choppin, P.W. 1971. Influenza virus. Structural and non-structural proteins in infected cells and their plasma membrane. *Virology* **46**: 830-843.
- Lipatov, A.S. 1997. Prevention and treatment of lethal influenza A virus. *Acta Virol.* **41(6)**: 337-340.
- Liu, C., Eichelberger, M.C., Compans, R.W., Air, G.M. 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J. Virol.* **69**: 1099-1106.
- Luoh, S.-M., McGregor, M.W., Hinshaw, V.S. 1992. Hemagglutinin mutations related to antigenic variation in H1 Swine influenza viruses. *J. Virol.* **66**: 1066-1073
- Mahy, B.W.J., Barret, T., Breidis, D.J., Brownson, J.M., Wolsten-Holme, A.J. 1980. Influence of the host cell on influenza virus replication. *Phil. Trans. R. Soc. London. Ser. B.* **288**: 349-357.
- McCauley, J.W., Mahy, B.J. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochem. J.* **211**: 281-294
- McGeoch, D., Fellner, P., Newton, C. 1976. The influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **73**: 3045-3049.
- Morin, M., Phaneuf, J.B., Sauvageau, R., Difrancia, E., Marsolais, G., 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., Lagacé, A. 1990. Severe proliferative and necrotizing pneumonia in pigs: A newly recognized disease. *Can. Vet. J.* **31**: 837-839
- Morongiello, M.P., Dales, S. 1977. Characterization of cytoplasmic inclusions formed during influenza WSN virus infection of chick embryo fibroblast cells. *Intervirology*, **8**: 281-293.

- Murphy, B.R., Webster R.G. 1990. Orthomyxoviruses. Virology. Second Edition, Fields, B.N. New-York. chapter 40 :1091-1152
- Murti, K.G., Webster, R.G. 1986. Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immunoelectron microscopy. Virology 149:36-43
- Natali, A., Panizzi, P.F., Chezzi, C. 1984. Human sera possess a limited antibody repertoire to influenza neuraminidase antigenic variants selected in-vitro. J. Hyg. 92: 243-250
- N'Diaye, M. 1995. Caractérisation d'un variant antigénique du virus influenza porcine type A (H1N1). Mémoire de Maîtrise. Université du Québec, Institut Armand-Frappier.
- Nouveau Larousse Medical. 1988, Ed Larousse, Domart, A., Bourneuf, J Chapitre G , p.465
- Ouchterlony, O. 1958. Diffusion in gel for immunological analysis, dans Kallar, P. & Waksman, B.H. (Ed.) : Progress in allergy : V: 1-78
- Oxford, J.S., Callow, K.A., Corcoran, T., Beare, A.S. 1982. Plaquing characteristics of influenza A virus recombinants of defined genetic composition Arch. Virol. 74: 227-232
- Palese, P., Jobita, K., Ueda, M., Compans, R.W. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology 61:397-410
- Pinto, L.H., Holsinger, L.J., Lamb, R.A. 1992. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell 69: 517-528
- Poljak, R.J. 1986. The predicted structure of immunoglobulin D1.3 and its comparison with the crystal structure. Science. 233: 747-753.
- Povinelli, L., Schilling, M., Krause, P., Jones, H-H., Ambrozaitis, A., Drinka, P., Shult, P., Gravenstein, S. 1998. Influenza B chemoprophylaxis in a long-term care facility using a novel neuraminidase inhibitor, zanamivir. International Conference on Emerging Infectious Diseases. Atlanta, Georgia, USA. P-17.2
- Raymond, F.L., Caton, A.J., Cox, N.J., Kendal, A.P., Brownlee, G.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
- Rekik, M.R., Arora, D.J.S., Dea, S. 1994. Genetic variation in swine influenza virus A isolate associated with proliferative and necrotizing pneumonia in pigs. J. Clin. Microbiol. 32:515-518
- Ritchey, M.B., Palese, P., Schulman J.L. 1976. Mapping of the influenza virus genome. III. Identification of genes coding for nucleoprotein, membrane protein, and nonstructural protein. J. Virol. 20:307-316

- Robertson, J.S., 1993. Clinical influenza virus and the embryonated Hen's egg. *Medical Virology*. 3:97-106
- Robertson, J.S., Nicolson, C., Major, D., Robertson, E.W., Wood, J.M. 1993. The role of amniotic passage in the egg-adaptation of human influenza virus is revealed by haemagglutinin sequence analyses. *J. Gen. Virol.* 74 : 2047-2051
- Robertson, J.S., Cook, P., Attwell A.-M., Williams S.P. 1995 Replicative advantage in tissue culture of egg-adapted influenza virus over tissue-culture derived virus: implications for vaccine manufacture. *Vaccine* 13:1583-1588
- Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 1989. *Immunology*. Second edition. Gordon Medical Publishing, New-York, USA
- Rota, P.A., Rocha, E.P., Armon, M.W., Hinshaw, V.S., Sheerar, M.G., Kawaoka, Y., Cox, N.J., 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.
- Ritchey, M.B., Palese, P. 1977. Live attenuated influenza virus vaccines. Strains with temperature sensitive defects in P3 protein and nucleoprotein. *J. Virol.* 78: 183-191
- Russell, R. J., Burns, W.H., White, D.O., Margot Anders, E., Ward, C.W., Jackson, D.C. 1979. Antigenic determinants of influenza virus hemagglutinin. III. Competitive binding of antibodies directed against "Common" and "strain-specific" antigenic determinants of A/Memphis/72 hemagglutinin. *J. Virol* 123:825-832.
- Saito, T., Taylor, G., Webster, R.G. 1995. Steps in maturation of influenza A virus neuraminidase. *J. Virol.* 69:5011-5017
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning, A laboratory manual* 2nd ed, CSH Press. USA.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulsen, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74: 5463-5467
- Schauer, R. 1983. in *Structural carbohydrates in the liver* (eds Popper, H., Reuter, W., Kittgen, E., Gudat, F.) (MTP, Boston, 1983) 83-97
- Schauer, R., 1985. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends biochem. Sci.* 10: 357-360
- Schild, G.C., Pereira, H.G. (1969). Characterization of ribonucleoprotein and neuraminidase of influenza A viruses by immunodiffusion. *J. Gen. Virol.* 4:355-363.

- Schild, G.C. 1972. Evidence for a new type-specific structural antigen of the influenza particle. *J. Gen. Virol.* **15**: 99-103
- Scholtissek, C., Burger, H., Bachmann, P.A., Hannoun, C. 1983. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology* **129**:521-523
- Schulman, J.L. 1975. The influenza viruses and influenza. Ed. Kilbourne, E.D. (Academic, New-York) 373-393
- Shaw, M.W., Compans, R.W. 1978. Isolation and characterization of cytoplasmic inclusions from influenza A Virus-infected cells. *J. Virol.* **25**:608-615.
- Skehel, J.J., 1973. Early polypeptide synthesis in influenza virus infected cells. *Virology* **56**:394-399.
- Stahl-Hennig, C., Voss, G., Nick, S., Petry, H., Fuchs, D., Wachter, H., Coulibaly, C., L, ke, W., Hunsmann, G. 1992. Immunization with Tween-ether treated SIV adsorbed onto aluminum hydroxide protects monkeys against experimental SIV infection. *Virology* **186**:588-596
- Tobita, K., Sugiura, A., Enomoto, C., Furuyama, M. 1975. Plaque assay and primary isolation of influenza A viruses in an established line of kidney cells (MDCK) in the presence of trypsin. *Med. Microbiol. Immunol.* **162**(1):9-14
- Ulmanen, I., Broni, B.A., Krug, R.M. 1981. The role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **78**:7355-7359.
- Ulmanen, I., Broni, B.A., Krug, R.M. 1983. Influenza virus temperature sensitive cap (m7GpppNm)-dependent endonuclease. *J. Virol.* **45**: 27-35.
- Valcarcel, J., Fortes, P., Ortin, J. 1993. Splicing of influenza virus matrix protein mRNA expressed from a simian virus 40 recombinant. *J. Gen. Virol.* **74** : 1317-1326
- Varghese, J.N., Laver, W.G., Colman P.M. 1983. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution. *Nature* **303**: 35-40
- Vines, A, Wells, K., Matrosovich, M., Castrucci, M.R., Ito, T., Kawaoka, Y. 1998. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J. Virol.* **72**:7626-7631
- Ward, C.W., Elleman, T.C., Azad, A.A. 1982. Amino acid sequence of the pronase-released heads of neuraminidase subtype N2 from the asian strain A/Tokyo/3/67 of influenza virus. *Biochem J.* **207**:91-95

- Webster, R.G., Hinshaw, V.S., Laver, W.G. 1982. Selection and analysis of antigenic variants of the neuraminidase of N2 influenza viruses with monoclonal antibodies. *Virology* **117**:93-104
- Webster, R.G., Brown, L.E., Laver, W.G. 1984. Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies. *Virology* **135**:30-42
- Wentworth, D.E., Thompson, B.L., Xu, X., Regnery, H.L., Cooley, A.J., McGregor, M.W., Cox, N.J., Hinshaw, V.S. 1994. An influenza A (H1N1) virus, closely related to swine influenza virus, responsible for a fatal case of human influenza. *J. Virol.* **68**:2051-2058
- Xu, X., Rocha, E.P., Regnery, H.L., Kendal, A.P., Cox, N.J.. 1993. Genetic and antigenic analyses of influenza A (H1N1) viruses, 1986-1991. *Virus Research* **28**:37-55
- Xu, X., Cox, N.J., Bender, C.A., Regnery, H.L., Shaw, M.W. 1996. Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* **224**:175-183

ANNEXE 1**PRÉPARATION DES SOLUTIONS****1) Tampon phosphate salin (PBS pour "phosphate buffer saline")****10 mM Phosphate pH7,4****0,8 % NaCl****0,12 % Na₂HPO₄****0,02 % KH₂PO₄****0,02 % KCl****Dissoudre dans de l'eau distillée****Ajuster à pH7,4 au besoin****2) Solutions pour test ELISA****Tampon d'adsorption****15 mM Na₂CO₃****35 mM NaHCO₃****0,02 % (p/v) NaN₃****Dissoudre dans de l'eau distillée****Ajuster à pH 9,6 au besoin****Solution de saturation****1 % (p/v) BSA****0,1 % (v/v) Tween20****Dissoudre dans du PBS****Ajuster à pH7,2 au besoin**

Solution de lavage

0,5 % (p/v) BSA,
0,05 % (v/v) Tween-20,
Dissoudre dans PBS
Ajuster à pH 7.2 au besoin.

Solution de révélation

0,04 % (p/v) OPD
0,012 % (v/v) H_2O_2 ,
0,05 M acide citrique,
100 mM Na_2HPO_4 ,
Ajuster à pH 5,0 au besoin

3) Solutions pour test NA (CDC, 1982)

Tampon phosphate 0,5M pH6,0

Solution A) 71,0g Na_2HPO_4 dans 1 L d'eau distillée

Solution B) 60,5 g de KH_2PO_4 dans 1 L d'eau distillée

Mélanger 200 mL de solution A avec 680 mL de solution B

Ajuster à pH 6,0 au besoin avec la solution A ou B

Solution de métapériodate de sodium

2,68 g de $NaIO_4$ dans 500 mL d'eau distillée

1,6 mL de H_2SO_4

Garder à TP

Solution d'arsenite de sodium

10 g de NaAsO_2

21,5 mL de HCl concentré (12N)

Garder à TP

Solution d'acide thiobarbiturique (TBA)

0,1 M acide 2-thiobarbiturique pH9,0

28,8 g TBA

7,6 g NaOH

Dissoudre dans 700 mL d'eau distillée en chauffant légèrement et agitant

Vérifier pH et ajuster à pH9,0

4) Solutions de chromatographie**Tampon acétate 10x**

0,5 M NaAcétate

20 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2 mM EDTA

Ajuster à pH5,5 au besoin

Tampon acétate 1x

50 mM NaAcétate

2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 mM EDTA

Ajuster à pH5,5 au besoin

5) Solution d'acide bicinchronique

Solution A; 0,025 M Acide bicinchronique(BCA, Pierce)
 0,2 M Carbonate de sodium hydraté
 0,01 M Tartrate de sodium
 0,1 M NaOH
 0,1 M Bicarbonate de sodium
 Ajustement du pH à 11,25

Solution B; 4% Sulfate de cuivre

Solution d'acide bicinchronique;

1 mL de solution A dans 49mL de solution B

6) Solution d'acécolysine

8,29 g/mL (NH₄)Cl
1,0 g/mL KCO₃
0,047 g/mL EDTA disodique

7) Tampon Tris- salin (TBS pour "Tris Buffer Saline")

0,8 % NaCl
0,02 % KCl
0,3 % Tris
0,05 % NaN₃

Dissoudre dans de l'eau distillée

Ajuster à pH 8,3

8) Solution D

4 M	Guanidine thiocyanate
25 mM	Na Citrate
0,5 %	Sarkosyl
0,1 M	2-mercaptoéthanol.

9) Solutions de biologie moléculaire**Tampon TEA;**

0,48 % (p/v)	Tris
1 mM	EDTA
0,11 % (v/v)	Acide acétique glacial

**Tampon d'échantillon;
(Sambrook 6.12).**

0,25 % (p/v)	Bleu de bromophénol
0,25 % (p/v)	Xylène cyanol
30 % (p/v)	Glycérol

Solution STET

8 %	Sucrose
5 %	Triton X-100
50 mM	EDTA
50 mM	Tris-HCl pH8,0

Solution de resuspension

50 mM	Tris pH7,5
10 mM	EDTA
100 µg/mL	RNase A

Solution de lyse

0,2 M	NaOH
1 %	SDS

Solution de neutralisation

1,32 M	KAcétate
--------	----------

Solution de lavage

80 mM	KAcétate
8,3 mM	Tris-HCl pH7,5
40 µM	EDTA
55 %.	Ethanol

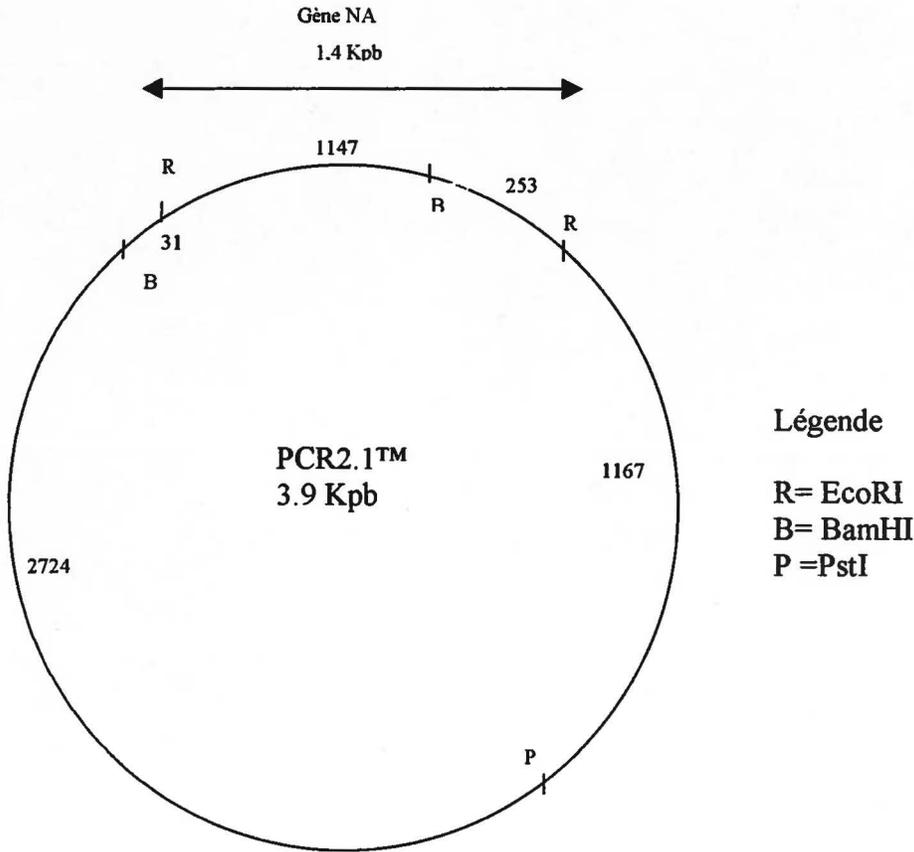
10) Milieu de culture cellulaire RPMI 1640 complet

10 %	SBF
2 mM	Glutamine
10 mM	HEPES
50 µg/mL.	Gentamycine

Dilué en milieu RPMI 1640 (Gibco)

ANNEXE 2

CARTE DE RESTRICTION DU PLASMIDE PCR2.1™ RECOMBINANT



ANNEXE 3**COMMUNICATIONS EN DATE DU DÉPÔT DE CE MÉMOIRE**

Des résultats de ces travaux ont été partiellement présentés à un congrès national et un congrès international;

- 1) Arora, D.J.S., et Retamal, M. 1997. Neuraminidase is drifting among swine influenza viruses (H1N1) associated with chronic respiratory disease. 47e Réunion annuelle de la Société Canadienne des Microbiologistes (SCM), Québec, Canada, 15 au 19 juin 1997
- 2) Retamal, M., et Arora, D.J.S. 1998. Effect of enzyme inhibiting monoclonal antibodies on the neuraminidase gene of swine influenza virus. International Conference on Emerging Infectious Diseases (ICEID). Atlanta, Georgia, U.S.A., 8 au 11 mars 1998

