

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN VIROLOGIE ET IMMUNOLOGIE

PAR

NANCY GASSE

**LES PROTÉINES DU VIRUS GRIPPAL ACTIVENT LA PROTÉINE KINASE
C DES LEUCOCYTES POLYMORPHONUCLÉAIRES HUMAINS**

OCTOBRE 1996

À mes parents, Roméo et Ghislaine

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
SOMMAIRE	x
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1.0 Généralités sur le virus influenza	6
1.1 Taxonomie	6
1.2 Propriétés physico-chimiques	6
1.3 Morphologie	7
1.4 Protéines	10
1.5 Cycle de réplication du virus grippal	15
2.0 L'hémagglutinine	18
2.1 Caractères généraux	18
2.2 Structure	19
2.3 Sites antigéniques	26
2.4 Fonctions	27
3.0 La neuraminidase	29
3.1 Caractères généraux	29
3.2 Structure	32
3.3 Sites antigéniques	34
3.4 Fonctions	35
4.0 Mécanismes de défense contre le virus influenza	37
4.1 Neutrophiles	39
4.1.1 Caractères généraux	39
4.1.2 Activation des neutrophiles et métabolisme oxydatif	41
4.1.3 Neutrophiles et virus influenza	43
5.0 Transduction des signaux chez les phagocytes	50
5.1 La protéine kinase C	51
5.1.1 Caractères généraux	51
5.1.2 Structure	54
5.1.3 Activation	61
5.1.4 Spécificité des substrats	66

MÉTHODOLOGIE	69
1.0 Préparation du matériel biologique	70
1.1 Virus	70
1.2 Culture et purification de la souche virale	70
1.2.1 Culture	70
1.2.2 Purification	70
1.3 Titre de l'activité hémagglutinante	72
1.4 Dosage protéique	73
1.5 Purification des protéines virales	74
1.5.1 Electrophorèse et conditions électrophorétiques	74
1.5.2 Electroéluion et dialyse des protéines	75
1.5.3 Extraction du SDS résiduel des échantillons	76
1.5.4 Chromatographie d'affinité sur colonne de NAPOA	77
1.6 Préparation des anticorps polyclonaux anti-NA/HA	78
1.6.1 Purification des anticorps	78
1.6.2 Fragmentation des anticorps par digestion à la pepsine	79
1.7 Gels analytiques	80
1.8 Coloration des gels analytiques	81
2.0 Préparation des PMNL	82
2.1 Isolement des PMNL	82
2.2 Stimulation des PMNL	83
2.3 Inhibition de l'activité PKC induite par le virus et les glycoprotéines par l'utilisation d'anticorps	83
2.4 Études de compétition	84
2.5 Isolement des fractions particulières et cytosoliques	84
3.0 Mesure de l'activité PKC	86
3.1 Activité PKC associée à la membrane cellulaire	86
3.2 Activité PKC de la fraction cytosolique	87
4.0 Statistiques	88
RÉSULTATS	89
1.0 Profil peptidique du virus et des protéines virales purifiés	90
1.1 Virus	90
1.2 Protéines virales	90
2.0 Activité PKC des PMNL	95
2.1 Réponse des PMNL face au virus entier	95
2.2 Courbe dose-réponse avec les glycoprotéines purifiées	96
2.3 Cinétique du temps	99
2.4 Comparaison du potentiel des divers stimulateurs pour activer la PKC	102

2.5 Effet des glycoprotéines biologiquement actives sur l'activité PKC	104
3.0 Spécificité des glycoprotéines	107
3.1 Inhibition par les fragments F(ab') ₂	107
4.0 Spécificité de la protéine kinase C	111
4.1 Inhibition de l'activité PKC un inhibiteur spécifique	111
4.2 Dépendance de l'activité PKC au calcium.....	111
4.3 Translocation de la PKC du cytosol à la membrane cellulaire	114
5.0 Compétition pour un site cellulaire	119
DISCUSSION	123
CONCLUSION.....	136
REMERCIEMENTS	139
BIBLIOGRAPHIE.....	142
ANNEXE 1	160
ANNEXE 2	163

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac-MBP.....	“acetylated peptide containing myelin basic protein”
ADNc.....	acide désoxyribonucléique complémentaire
aPKC.....	protéine kinase C atypique
ARN.....	acide ribonucléique
ARNc.....	acide ribonucléique complémentaire
ARNm.....	acide ribonucléique messenger
ARNv.....	acide ribonucléique viral
ATP.....	adénosine triphosphate
BSA.....	“bovine serum albumin”
CD.....	“cluster designation”
cPKC.....	protéine kinase C conventionnelle
DAG.....	diacylglycérol
EDTA.....	disodium éthylènediaminetétraacétate dihydrate
FMLP.....	N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine
G-CSF.....	“granulocyte stimulating factor”
GM-CSF.....	“granulocyte-macrophage colony stimulating factor”
h.....	heure
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HA.....	hémagglutinine
HBSS.....	“Hanks' balanced salt solution”
IL-1.....	interleukine-1
IL-3.....	interleukine-3
IP ₃	inositol 1,4,5-triphosphate
kDa.....	kilodaltons
LFA.....	“leukocyte function antigen”
M.....	protéine matricielle
min.....	minute
MPO.....	myéloperoxydase
NA.....	neuraminidase
NADPH.....	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NAPOA.....	N-(p-aminophenyl) oxamique acide
NK.....	“natural killer”
NP.....	nucléoprotéine
nPKC.....	protéine kinase C nouvelle
O ₂ ⁻	anion superoxyde
PBS.....	“phosphate buffered saline”
pmol.....	picomole
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

PIP ₃	phosphatidylinositol 1,4,5-biphosphate
PKC.....	protéine kinase C
PLC.....	phospholipase C
PMA.....	phorbol 12-myristate 13-acétate
PMNL.....	leucocyte polymorphonucléaire
PS.....	phosphatidylsérine
RNP.....	ribonucléoprotéique
TNF.....	facteur de nécrose des tumeurs
U.V.....	ultraviolet
V.....	volt

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Protéines du virus influenza.....	11
Tableau II. Caractéristiques des isoformes de la PKC.....	55
Tableau III. Comparaison du potentiel des divers stimulateurs pour activer la PKC.	103
Tableau IV. Effet des glycoprotéines biologiquement actives sur l'activité PKC.....	105
Tableau V. Translocation de la PKC.....	118

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique du virus influenza.....	8
Figure 2. Organisation de l'hémagglutinine.....	20
Figure 3. Structure tertiaire de la HA et arrangement trimérique.....	24
Figure 4. Structure de la neuraminidase.....	30
Figure 5. Réactions du métabolisme oxydatif.....	44
Figure 6. Organisation des diverses régions retrouvées chez les trois groupes de PKC.....	57
Figure 7. Modèle d'activation de la PKC.....	63
Figure 8. Profil peptidique du virus grippal.....	91
Figure 9. Vérification de la pureté des protéines virales.....	93
Figure 10. Activité de la PKC des PMNL humains en fonction de la concentration de glycoprotéines.....	97
Figure 11. Activité de la PKC des PMNL humains en fonction du temps.....	100
Figure 12. Inhibition de l'activité PKC des PMNL humains par les fragments F(ab') ₂ anti-NA/HA.....	108
Figure 13. Inhibition de l'activité PKC des PMNL humains par un inhibiteur spécifique.....	112
Figure 14. Dépendance au calcium de la PKC des PMNL humains.....	115
Figure 15. Compétition entre les divers stimulateurs pour un site cellulaire pour activer la PKC des PMNL.....	120

SOMMAIRE

Le virus influenza active les leucocytes polymorphonucléaires (PMNL). Ces cellules jouent un rôle important dans la défense précoce contre le virus grippal et dans la guérison de l'hôte. Des évidences récentes indiquent que la phosphorylation de protéines, via la protéine kinase C (PKC), est un procédé majeur dans l'activation des PMNL. La PKC est une enzyme membranaire qui joue un rôle crucial dans la transduction de signaux qui peuvent mener à des réponses immunitaires ou à des mécanismes de défense. Nous avons donc étudié l'effet des protéines du virus grippal sur l'activité PKC des PMNL humains.

Les PMNL ont été isolés du sang provenant de donateurs volontaires. Ils ont été incubés en présence du virus influenza de type A et des protéines virales purifiées, soit l'hémagglutinine (HA), la neuraminidase (NA) et la protéine matricielle (M). Les cellules stimulées ont par la suite été incorporées à un milieu réactionnel et l'activité PKC ($\text{pmol}/2 \times 10^5$ cellules/min) a été mesurée en quantifiant l'incorporation de phosphates radioactifs dans un substrat synthétique spécifique à l'enzyme.

Le virus influenza ($67,4 \pm 3,8$) augmentent de façon significative l'activité PKC des PMNL humains, par rapport aux cellules non stimulées ($20,3 \pm 0,9$). Les composantes virales, responsables de cette élévation

d'activité PKC, ont été identifiées. Une augmentation significative est observée chez les PMNL incubés en présence de 0,25 µg des protéines virales purifiées, soit la HA dépourvue de son activité hémagglutinante ($80,0 \pm 7,6$), la NA sans activité enzymatique ($83,6 \pm 9,0$) et la protéine M ($86,2 \pm 9,0$). Les oligosaccharides présents sur la HA et la NA ne paraissent pas jouer de rôle critique dans l'activation de la PKC puisque la protéine M, qui est non glycosylée, a un potentiel d'activation similaire à celui des glycoprotéines. De plus, l'activation de la PKC est indépendante de l'activité hémagglutinante de la HA et de l'activité enzymatique de la NA car les glycoprotéines dotées de leur activité biologique ont un potentiel d'activation similaire à celui des glycoprotéines dépourvues de leur activité biologique.

Les résultats démontrent que l'augmentation d'activité PKC observée est spécifique aux protéines virales. Cette assertion se base selon les observations suivantes. D'abord, l'albumine sérique bovine ($23,0 \pm 1,2$), qui a été utilisée à titre de témoin ne provoque pas d'augmentation d'activité PKC significative par rapport au PMNL non stimulés ($20,3 \pm 0,9$). De plus, l'activité PKC induite par les glycoprotéines est inhibée par la présence d'anticorps anti-NA/HA. Les cellules qui ont été traitées avec le complexe virus (5 µg)-anticorps (10 µg) montrent une diminution d'activité de 47% par

rapport aux cellules incubées avec le virus seul et des diminutions de 58% et 65% ont été observées chez les PMNL incubés avec les complexes HA (0,25 μ g)-anticorps (10 μ g) et NA (0,25 μ g)-anticorps (10 μ g) respectivement.

Les résultats démontrent également que la PKC est responsable de l'augmentation d'activité observée. D'abord, la translocation qui est un index de l'activation enzymatique a été observée. Chez les PMNL non stimulées l'activité PKC se situe au niveau du cytosol et une stimulation avec la HA et la NA provoque une baisse d'activité cytosolique qui s'est trouvée cinq fois moins élevée après 30 min de stimulation. Quant à l'activité membranaire, elle s'est trouvée quatre fois plus élevée. La translocation s'est également produite chez les cellules stimulées par le virus purifié. L'activité membranaire a augmenté environ quatre fois après 30 min de stimulation parallèlement à une diminution de l'activité cytosolique du même ordre. Deuxièmement, un inhibiteur spécifique à l'enzyme a été incorporé dans le milieu réactionnel. Les résultats démontrent que la présence de 50 μ M d'inhibiteur provoque une chute d'activité de plus de 90%. Troisièmement, les résultats indiquent que les isoformes α et/ou β de la famille des PKC conventionnelles (cPKC) ont été activés car l'absence de calcium dans le milieu réactionnel a provoqué une

diminution d'activité de plus de 80% chez les cellules stimulées par le virus et les glycoprotéines. Enfin, la phosphorylation d'un substrat spécifique permettant la détection sélective des cPKC confirme ces résultats.

Le ou les mécanismes impliqués dans l'activation de la PKC par les protéines virales restent à déterminer. Toutefois, les résultats suggèrent l'implication d'un site cellulaire. Les études de compétition indiquent que la HA et la NA ciblent le même site cellulaire et ce dernier est évidemment différent de celui utilisé par le PMA. Les PMNL traités par la HA (0,25 µg) et subséquemment stimulés avec le PMA (1 µM) montrent une augmentation d'activité PKC ($134,5 \pm 1,8$) près de deux fois supérieure par rapport à l'activité PKC des PMNL stimulés par HA seulement ($75,8 \pm 2,5$). Quant aux cellules traitées par HA et subséquemment stimulées par la NA ($74,7 \pm 2,3$), elles ne montrent aucune différence significative par rapport aux cellules stimulées par HA seulement. Les observations sont similaires chez les cellules qui ont d'abord été traitées par la NA. Enfin, si un site cellulaire est impliqué dans l'activation de la PKC par les protéines virales, ce dernier est différent du site d'attachement de la HA puisque la HA dotée de son activité hémagglutinante provoque une activation PKC similaire à celle de la HA dépourvue d'activité hémagglutinante.

Dans leur ensemble, nos résultats montrent le potentiel des protéines virales purifiées pour stimuler l'activité de la PKC. L'activation de cette enzyme pourrait être particulièrement intéressante étant donné le rôle clé qu'elle joue dans l'induction de réponses immunitaires et de mécanismes de défense qui contribuent à la défense contre une infection grippale.

INTRODUCTION

La grippe est une maladie des voies respiratoires supérieures très contagieuse causée par le virus grippal ou virus influenza. Ce dernier, qui est responsable de 20 millions de morts dans les années 1918 et 1919, a été isolé pour la première fois chez l'humain en 1933 (Kilbourne, 1987). Il est aujourd'hui classé en trois types: A, B et C, qui peuvent tous infecter l'humain. Le virus de type A, qui est le plus répandu, comprend différents sous-types et les sous-types H1N1, H2N2 et H3N2 sont responsables des infections chez l'homme. L'émergence de nouveaux sous-types est généralement associée avec des épidémies plus ou moins sévères. Les sous-types H2N2 et H3N2 sont respectivement responsables des épidémies de grippe asiatique de 1957 et de grippe de Hongkong de 1968 (Wilson et Cox, 1990; Kilbourne, 1987). Cette grande capacité de variation fait de ce virus l'un des agents infectieux que nous ne pouvons toujours pas contrôler à long terme.

La défense contre le virus influenza implique plusieurs composantes du système immunitaire. Entre autres, les macrophages et les neutrophiles représentent les premières lignes de défense rencontrées par le virus au moment de son entrée dans l'organisme. Chez les macrophages, des substances immunorégulatrices telles que le facteur de nécrose des tumeurs (TNF) et l'interleukine-1 (IL-1) et des substances antivirales telles

que des réactifs oxygénés sont induites par le virus grippal ou par ses protéines purifiées (Roberts et al., 1986; Arora et Houde, 1991). Les neutrophiles sont également activés par le virus et en résultat à cette activation, ils génèrent des mécanismes de défense tels que le métabolisme oxydatif et la phagocytose (Hartshorn et al., 1992b).

Des évidences récentes indiquent que la phosphorylation de protéines, via la PKC, est un procédé majeur dans l'activation des cellules phagocytaires. (Wenzel-Seifert et al., 1994; Phillips et al., 1992). La PKC est une enzyme associée à la membrane des phagocytes et elle joue un rôle crucial dans la transduction de signaux qui peuvent mener à des réponses immunitaires ou à des mécanismes de défense. Son implication dans la production de l'IL-1 et du TNF chez les macrophages et dans la stimulation du métabolisme oxydatif chez les neutrophiles a été démontrée (Shapira et al., 1994; Wolfson et al., 1985).

La PKC représente une famille de 12 isoformes qui sont classées en trois groupes selon leurs caractéristiques structurales et biochimiques, soit les cPKC, les PKC nouvelles (nPKC) et les PKC atypiques (aPKC). Chez les cellules phagocytaires, les cPKC et les nPKC ont été décrites (Wenzel-Seifert et al., 1994; Devalia et al., 1992). Les PKC de ces deux groupes

peuvent être activées de façon exogène par une action directe avec les phorbols esters qui se lient sur un site spécifique de l'enzyme, ou de façon endogène par les diacylglycérols (DAG) qui sont produits suite à une interaction entre un agoniste et un autre récepteur cellulaire. De plus, l'activation des cPKC est dépendante du calcium alors que celle des nPKC en est complètement indépendante (Pears, 1995).

Étant donné le rôle important que jouent les neutrophiles dans la phase précoce contre une infection grippale et dans la guérison de l'hôte, l'activation de ces cellules par le virus influenza est un phénomène qui attire une attention considérable (Hennet et al., 1992; Hartshorn et al., 1992a; 1992b; Tsuru et al., 1987). Nos résultats précédents démontrent que les protéines purifiées HA, NA et M du virus influenza stimulent le métabolisme oxydatif des neutrophiles humains (Arora et Henrichon, 1994). De plus, Hartshorn et al., (1992b), ont démontré que l'inhibition de l'activité PKC réduit le métabolisme oxydatif des neutrophiles exposés au virus influenza. Considérant le rôle clé que joue la PKC dans l'induction de ce mécanisme de défense, nous avons donc voulu vérifier l'effet des protéines du virus grippal sur l'activité PKC des neutrophiles humains.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 Généralités sur le virus influenza

1.1 Taxonomie

Le virus grippal fait partie de la famille des orthomyxoviridae et ne compte qu'un seul genre, l'influenzavirus. Les trois types sérologiques A, B et C qui sont répertoriés sont définis à partir des propriétés antigéniques de leur protéine M et de leur nucléoprotéine (NP). Le type A, qui est responsable de la majorité des pandémies et des épidémies, infecte une grande variété de mammifères (hommes, porcs, chevaux) et les oiseaux, tandis que les virus de type B et C sont exclusivement des pathogènes humains (Kilbourne, 1987). De plus, chez les virus de type A, les propriétés antigéniques de leurs glycoprotéines HA et NA déterminent les différents sous types (Wilson et Cox, 1990). Il existe à ce jour 14 sous types HA et 9 sous types NA (Lin et al., 1994). Les sous types H1N1, H2N2 et H3N2 sont ceux retrouvés lors d'une infection chez l'humain et les sous types H1N1 et H3N2 sont présentement en circulation (Shaw et al., 1992).

1.2 Propriétés physico-chimiques

Le virus influenza est une particule de 80 à 120 nm de diamètre (Murphy et Webster, 1990) dont la masse moléculaire est environ 250×10^3 kDa (Kilbourne, 1987). Le coefficient de sédimentation du virus est de 700 à 800 s et sa densité sur gradient de saccharose est 1.19 g/cm^3 . Les

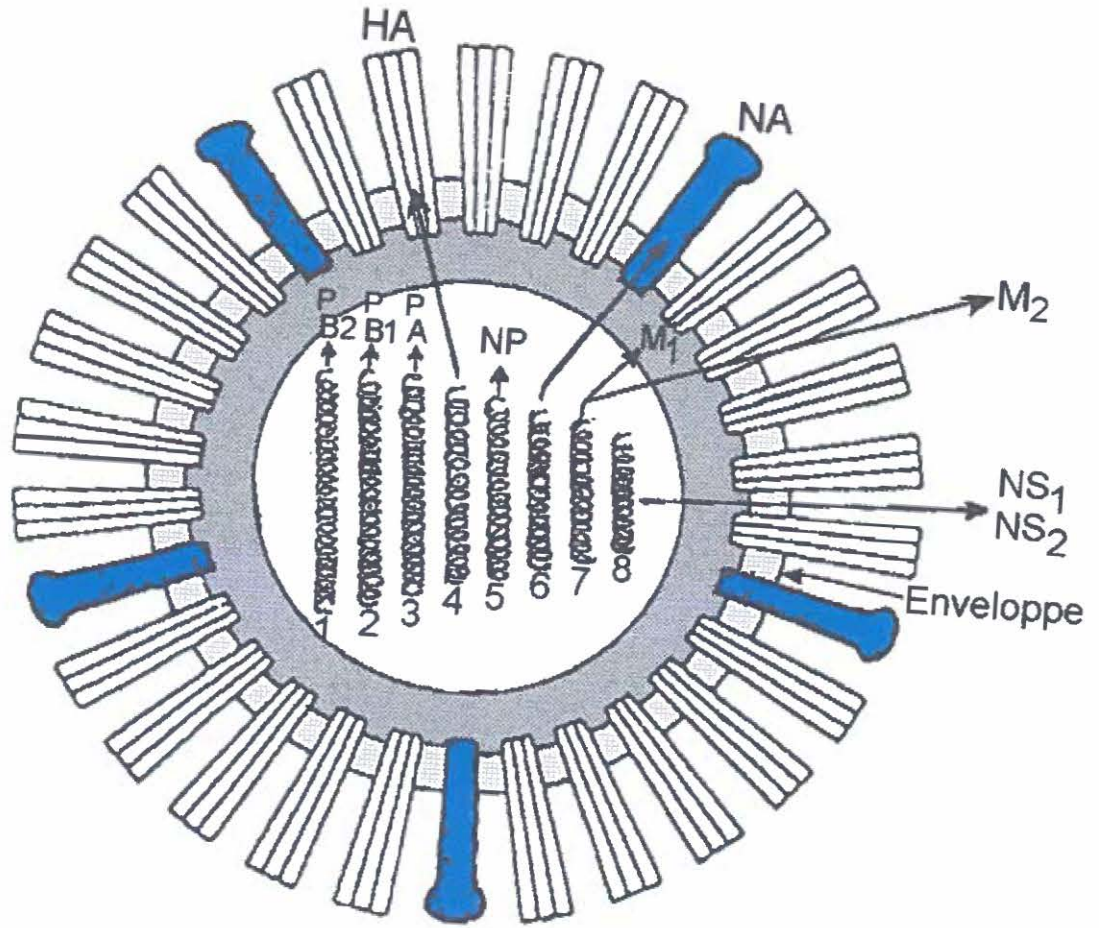
différentes composantes du virus sont 70 à 75 % de protéines, 20 à 24 % de lipides 5 à 8 % d'oligosaccharides et 0,8 à 1 % d'ARN (Choppin et Compans, 1975) . L'infectivité du virus diminue grandement à pH acides et en présence des rayons ultraviolets (U.V.). De plus, il peut être rapidement inactivé à des températures supérieures à 56°C (Klenk, 1991).

1.3 Morphologie

Le virus grippal provenant d'isolats frais est une particule pléomorphe pouvant aussi être filamenteuse (Murphy et Webster, 1990). Toutefois, les souches adaptées au laboratoire sont généralement sphériques tel que démontré à la figure 1 (Zuckerman, 1996; Lamb et Choppin, 1983). La particule virale présente à sa surface des spicules, soit les glycoprotéines HA et NA et elle est enveloppée d'une couche de lipoprotéines dérivée de la cellule hôte. Sous l'enveloppe lipidique se retrouve la protéine M1 qui forme une couche renfermant la nucléocapside. Cette dernière comprend huit segments d'ARN à polarité négative, dont les extrémités 5' et 3' sont conservées. La NP et les polymérases virales PB1, PB2 et PA s'associent à ces segments d'ARN pour ainsi former les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) hélicoïdaux (Murphy et Webster, 1990).

Figure 1. Représentation schématique du virus influenza.
(d'après Zuckerman, 1996)

Le virus influenza comprend huit segments d'ARN à polarité négative qui forment, en association avec la protéine NP et les polymérases PB1, PB2, et PA, les complexes RNP. La protéine M1 se trouve sous l'enveloppe lipidique sur laquelle se trouvent greffées les glycoprotéines de surface HA et NA. Les protéines M2, NS1 et NS2 sont non structurales.



1.4 Protéines

Numérotés par ordre décroissant de poids moléculaire, les huit segments d'ARN du virus influenza codent pour dix polypeptides. Les segments 1 à 6 codent pour les protéines structurales PB2, PB1, PA, HA, NP et NA respectivement. Le segment 7 code pour la protéine M1 qui est structurale et la protéine M2 qui est non structurale. Quant au segment 8 il code pour deux protéines non structurales soit NS1 et NS2 (Murphy et Webster, 1990). Le tableau I résume les caractéristiques de ces protéines virales ainsi que leurs rôles possibles.

Les protéines PB1, PB2 et PA sont codées par des gènes qui font respectivement 2340, 2340 et 2230 nucléotides de long. Constituées respectivement de 757, 759 et 716 résidus d'acide aminés, elles sont des composantes de l'ARN polymérase (Lamb et Choppin, 1983). La masse moléculaire pour chacune de ces protéines est 86 kDa pour la PB1, 84 kDa pour la PB2 et 83 kDa pour la PA. Associées aux segments d'ARN par des liaisons non covalentes, elles sont présentes dans le virion dans une moyenne de 30 à 60 molécules par particules virales (Lamb, 1989). Ces trois protéines sont impliquées dans la synthèse des ARN viraux (ARNv). La protéine PB2 permet une liaison de la transcriptase avec la coiffe des ARN messagers (ARNm) cellulaires utilisés comme amorce pour la

Tableau I. Protéines du virus influenza.
(d'après Shaw *et al.*, 1992)

Gène	Longueur du gène (nucléotides)	Protéines	Masse moléculaire (kDa)	Fonctions
1	2340	PB2	84	Transcription de l'ARN.
2	2340	PB1	86	Transcription et réplication de l'ARN.
3	2230	PA	83	Implication probable dans la réplication de l'ARN.
4	1765	HA	75	Attachement du virus aux récepteurs de la cellule, entrée du virus dans la cellule et fusion des membranes virales et cellulaires.
		(HA1) [*] (HA2) [*]	(50) (25)	
5	1565	NP	56	Initiation de la transcription, élongation de l'ARN, antitermination durant la synthèse de l'ARN.
6	1413	NA	55	Action enzymatique responsable de la coupure du lien α -cétonique sur les récepteurs cellulaires reconnus par la HA.
7	1025	M1	28	Assure le transport du complexe RNP, sert de jonction entre la nucléocapside et la membrane virale, impliquée dans l'arrêt de la réplication de l'ARN.
7	1025	M2	15	Pompe à ions H ⁺ .
8	890	NS1	25	Régulateur du transport des ARNm, rôle dans l'arrêt de la synthèse protéique cellulaire et de l'ARN viral.
8	890	NS2	12	inconnue

*Les portions HA1 et HA2 sont obtenues suite à un clivage protéolytique de la protéine HA.

synthèse des ARNm viraux. De plus, elle joue un rôle dans l'initiation de la synthèse des ARNm. Quant à la protéine PB1, elle est impliquée dans l'élongation de la molécule d'ARN. Le polypeptide PA n'a toujours pas de rôle défini. Toutefois, son implication dans la synthèse d'ARN pourrait être importante puisque cette protéine est associée aux protéines PB2 et PB1 et elles progressent toutes trois en même temps sur la molécule d'ARN (Barcena. et al., 1994).

La NP, qui est codée par un segment qui fait 1565 nucléotides de long, se divise en deux classes phylogénétiquement différentes dont une est d'origine humaine et l'autre d'origine aviaire (Gammelin et al., 1989). Cette protéine est constituée de 498 résidus d'acide aminés et possède une masse moléculaire de 56 kDa (Shaw et al., 1992). Elle est la composante structurale majeure du virion qui interagit avec l'ARN génomique (Lamb, 1989). Hautement phosphorylée, la NP est abondante dans le virion, soit environ 1000 molécules par particule virale (McCauley et Mahy, 1983). Associée aux ARNv, elle protège ces derniers contre la dégradation. Plusieurs autres rôles lui sont également attribués, soit l'initiation de la transcription (Barcena et al., 1994), l'élongation de la chaîne d'ARN (Shapiro et Krug, 1988) et finalement l'antiterminaison durant la synthèse de l'ARNm (Beaton et Krug, 1986).

La protéine M1 quant à elle est la plus abondante du virus, environ 3000 molécules par particules virales. Codée par le segment 7 qui fait 1025 nucléotides de long, elle est constituée de 252 résidus d'acides aminés et elle possède une masse moléculaire de 28 kDa (McCauley et Mahy, 1983). La protéine M1 forme la couche épaisse retrouvée sous l'enveloppe lipidique du virus. Cette protéine intervient à plusieurs niveaux au cours du cycle de réplication du virus. Elle assure le transport du complexe RNP, nouvellement formé, du noyau de la cellule hôte vers le cytoplasme (Martin et Helenius, 1991) et elle sert de jonction entre la nucléocapside et la membrane plasmique (Choppin et al., 1972). De plus, il semble qu'elle soit impliquée dans l'arrêt de la réplication d'ARN, ce qui montre le rôle régulateur que joue cette protéine permettant ainsi de passer de la réplication de l'ARN à la maturation du virus (Yasuda et al., 1994).

La protéine M2 est synthétisée par suite d'un épissage de l'ARNm transcrit à partir du segment 7. Cette protéine est composée de 97 résidus d'acides aminés et possède une masse moléculaire de 15 kDa. M2 est une protéine transmembranaire abondamment exprimée à la surface des cellules infectées mais très peu représentée dans le virus, 23 à 60 molécules par particules virales sont retrouvées (Lamb, 1989). De plus, cette protéine ne se retrouve que chez les virus influenza de type A (Shaw

et al., 1992). La protéine M2 a la propriété d'agir comme pompe à ions H⁺ lui permettant d'intervenir à plusieurs niveaux dans la réplication du virus. D'abord, elle prend part à l'acidification du compartiment endosomal, ce qui entraîne un changement conformationnel de la protéine de surface HA, permettant ainsi la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomale (Pinto et al., 1992). Elle joue également un rôle au moment de la décapsidation en permettant l'hydrolyse de la jonction entre la protéine M1 et la nucléocapside libérant alors le complexe RNP (Yasuda et al., 1994).

Les protéines les moins connues chez le virus influenza sont les protéines non structurales NS1 et NS2. Elles sont le produit du gène 8 qui fait 890 nucléotides de long et elles ne sont retrouvées que dans les cellules infectées (Shaw et al., 1992; Lamb, 1989). La protéine NS1 qui est phosphorylée est constituée de 237 résidus d'acide aminés et elle possède une masse moléculaire de 25 kDa (Krug, 1989). Le rôle de la protéine NS1 n'est toujours pas décrit d'une façon précise. Cependant, il est clair que la NS1 possède un domaine lui permettant de se lier de façon spécifique aux queues de poly(A) des ARNm et cette particularité, que possède la NS1 de se lier aux séquences polyadénylées, lui conférerait un rôle de régulateur du transport des ARNm autant cellulaires que viraux (Qian et al., 1994; Qiu

et Krug, 1994). De plus, un rôle dans l'arrêt de la synthèse protéique cellulaire et de la synthèse de l'ARN viral lui a été attribué (Koennecke et al., 1981; Wolstenholme et al., 1980). Quant à la protéine NS2, peu d'informations sont disponibles. D'une masse moléculaire de 12 kDa, elle est composée de 121 acides aminés et elle est synthétisée par suite d'un épissage de l'ARNm transcrit à partir du segment 8 (Shaw et al., 1992). La localisation de NS2 dans les cellules infectées ainsi que la ou les fonctions qu'elle possède ne sont toujours pas connues (Lamb, 1989).

Les glycoprotéines de surface HA et NA qui sont l'objet de ce projet sont décrites plus en détails dans les sections 2.0 et 3.0.

1.5 Cycle de réplication du virus grippal

La première étape du cycle de réplication du virus influenza se caractérise par l'adsorption du virus par sa HA aux résidus d'acide sialique (acide *N*-acétyl-neuraminique α 2-3 ou α 2-6 galactose) des récepteurs cellulaires (Rogers et al., 1983). Le virus pénètre ensuite dans la cellule par endocytose, où dans des conditions acides, la HA est clivée en HA1 et HA2. Ce clivage contribue à la fusion des membranes virale et cellulaire menant ainsi à la décapsidation et à la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme (Carr et Kim 1994).

La nucléocapside est libérée dans le cytoplasme et migre vers le noyau où s'effectue la réplication du génome viral, caractérisée par trois phases (Shapiro et al., 1987; Marsh et Helenius, 1989). La première phase qui est indépendante de la synthèse protéique, soit la transcription primaire, résulte en la synthèse de deux types d'ARN: ARNm qui sont coiffés et polyadénylés et qui seront traduits en protéines et les ARN complémentaires (ARNc) qui sont non coiffés et non polyadénylés servant de matrice pour les ARNv. Ces deux types d'ARN sont produits à partir de chacun des 8 segments d'ARN de polarité négative à l'aide des ARNm cellulaires qui servent d'amorces, des polymérases virales PB1, PB2 et PA et de l'ARN polymérase II de la cellule hôte (McCauley et Mahy, 1983). La deuxième phase, la transcription secondaire précoce, est dépendante de la synthèse protéique. La synthèse d'ARNc atteint son maximum 30 à 90 minutes après l'infection et est accompagnée d'une synthèse amplifiée des ARNm et des ARNv des segments 5 et 8. Au moment de la dernière phase, la transcription secondaire tardive, la synthèse des ARNm et les ARNv des segments 4, 6 et 7 est amplifiée alors que celle des ARNm, des ARNc et des ARNv du segment 8 diminue. Tout au long de la transcription secondaire, la synthèse des ARNm et des ARNv du segment 5 reste élevée tandis que celle des segments 1 à 3 demeure faible (Lamb et Choppin, 1983; McCauley et Mahy, 1983).

Les ARNm nouvellement synthétisés sont transportés du noyau vers le cytoplasme de l'hôte où s'effectue la synthèse des protéines virales. (Shapiro et al., 1987). Quant aux nouveaux ARNv, ils sont également transportés vers le cytoplasme. Ils s'associent aux protéines NP, PB1, PB2 et PA nouvellement synthétisées pour ainsi former les complexes RNP qui eux se lient à la protéine M1. L'assemblage du virus se complète par une liaison à la membrane plasmique sur laquelle les glycoprotéines de surface HA et NA sont exprimées (Lamb et Choppin, 1983).

2.0 L'hémagglutinine

2.1 Caractères généraux

L'hémagglutinine est une glycoprotéine de surface codée par le segment quatre du génome viral. Distribuée de façon uniforme à la surface du virus, elle représente environ 25% des protéines totales et approximativement 80% des projections de surface (Webster *et al.*, 1982). Des études de microscopie électronique montrent que la HA est sous forme de bâtonnet ayant une dimension de 135 Å de longueur par 40 Å de largeur. Elle est présente à la surface du virus sous la forme d'un trimère de 225 kDa qui est composé de trois monomères identiques de 75 kDa liés de façon non covalente (Wilson et Cox, 1990). La HA est synthétisée en un unique polypeptide (HA0) qui subit plusieurs modifications post-traductionnelles: (1) la glycosylation qui se fait dans le reticulum endoplasmique rugueux de l'hôte (Wilson et Cox, 1990; Wiley et Skehel, 1987), (2) le clivage par protéolyse du peptide signal hydrophobe de 16 résidus situé en position N-terminal (Lamb et Choppin, 1983; Air, 1979), (3) l'association de trois monomères formant ainsi le trimère (Murphy et Webster 1990), (4) le clivage protéolytique par des protéases cellulaires en deux chaînes polypeptidiques, HA1 et HA2 qui sont à l'origine fermement associées par un pont disulfure entre les résidus Cys 14 de HA1 et Cys 137 de HA2 (Wilson et Cox, 1990; Murphy et Webster, 1990) et (5)

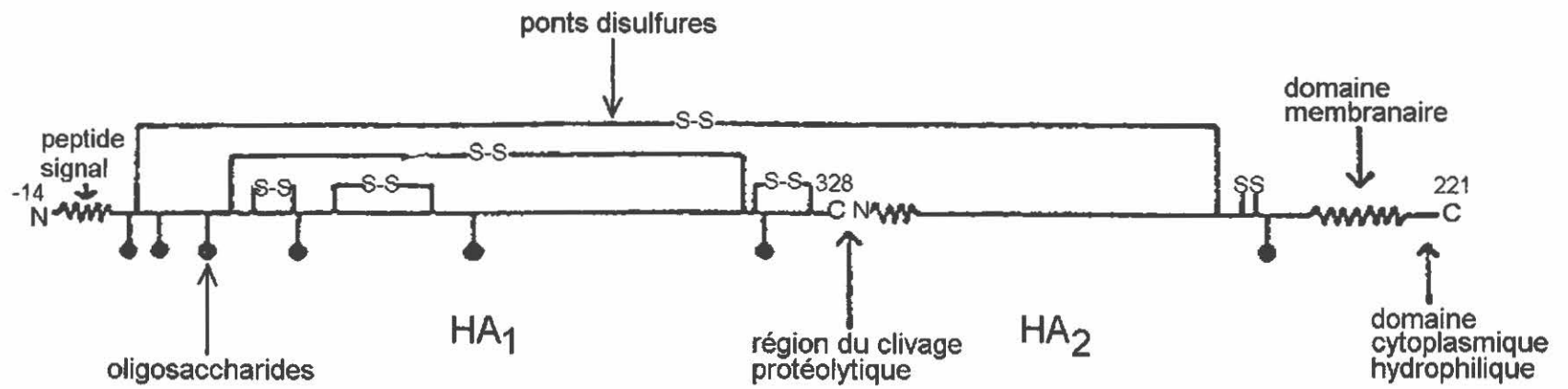
l'attachement d'acides gras sur des résidus Cys (Naeve et Williams, 1990; Steinhauer et al., 1991).

2.2 Structure

La segment 4 codant pour l'hémagglutinine fait 1765 nucléotides de long dont 20 nucléotides qui précèdent le codon d'initiation AUG, la région transcrite et une région 3'-terminale non transcrite de 35 nucléotides. La protéine HA (figure 2) synthétisée à partir de ce gène est composée de 566 acides aminés, soit un peptide signal de 14 résidus, une portion HA1 de 328 résidus et 221 résidus pour la portion HA2, un acide aminé (Arg) étant perdu lors du clivage protéolytique (Lamb et Choppin, 1983). La portion N-terminale de HA2 qui est hydrophobe et hautement conservée parmi les souches est probablement impliquée dans le processus de pénétration du virus. Quant à la portion C-terminale de HA2, il y a une région de 24 acides aminés hydrophobes qui traversent la couche lipidique permettant l'ancrage de la protéine dans l'enveloppe virale (Murphy et Webster, 1990). Les portions HA1 et HA2 sont maintenues ensemble par un pont disulfure interchaîne, des ponts disulfures intrachaînes sont aussi présents, dont quatre au niveau de HA1 entre les résidus 42 et 273, 55 et 67, 90 et 134 et 277 et 301 ainsi qu'un pont au niveau de HA2 entre les résidus 144 et 148 (Waterfield et al., 1981; Ward, 1981).

Figure 2. Organisation de l'hémagglutinine.
(d'après Lamb et al., 1983)

Le monomère est constitué de deux portions, HA1 et HA2, qui sont maintenues ensemble par un pont disulfure interchaîne. Le peptide signal à l'extrémité N-terminale (qui débute au résidu -14) est suivi de la portion HA1 (qui se termine au résidu 328), de la région du clivage protéolytique, de la portion HA2 (qui se termine au résidu 221), du domaine membranaire et du domaine cytoplasmique hydrophilique. La portion HA1 comprend quatre ponts disulfures intrachaînes et HA2 en contient un. Les oligosaccharides sont présents en majorité sur la portion HA1.



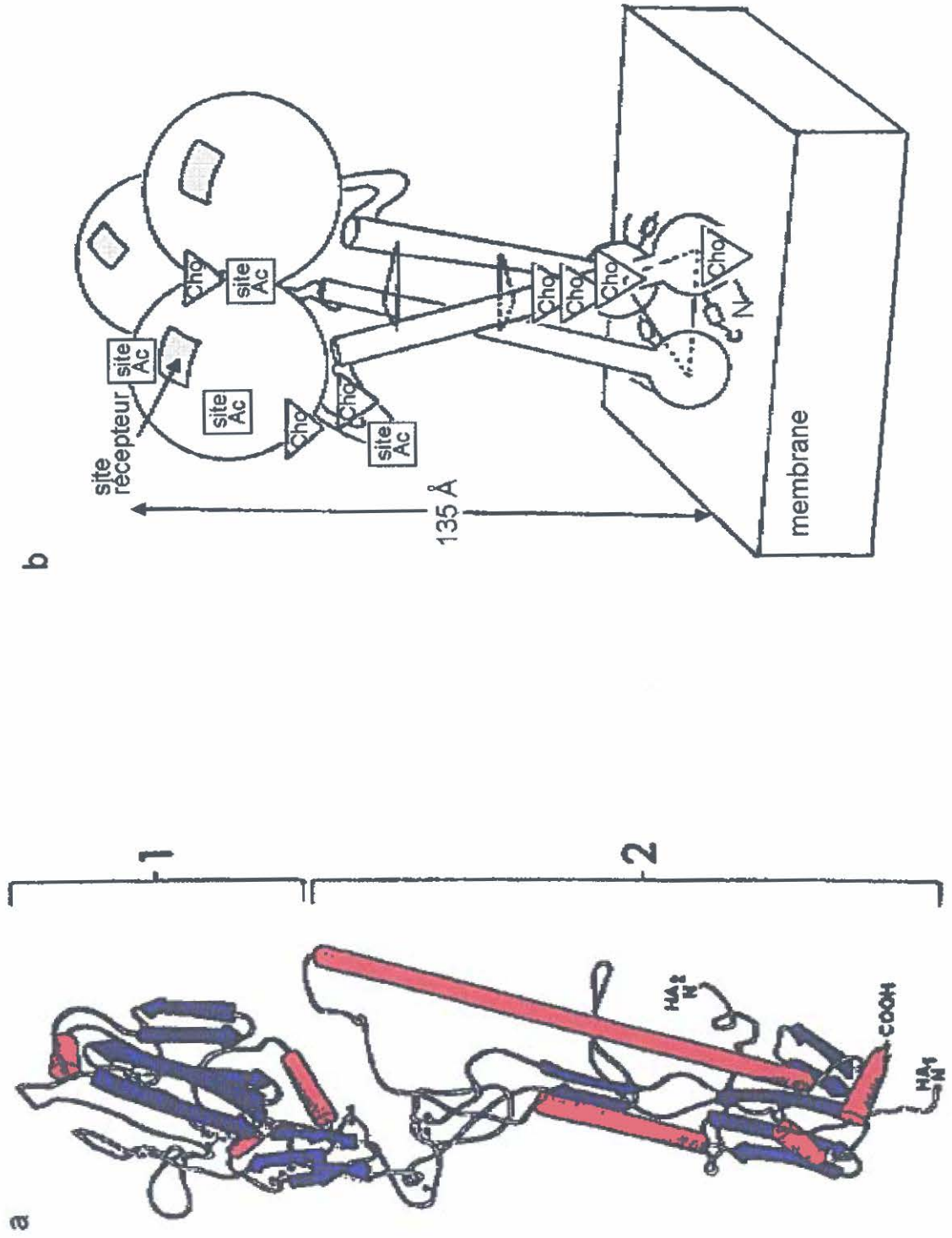
Les oligosaccharides présents sur les glycoprotéines HA et NA originent de l'hôte. Ils sont attachés aux résidus Asn par des liaisons N-glycosidiques et sont classés en deux types, soit le type I qui se compose de glucosamine, mannose, galactose et fucose et le type II qui se compose de glucosamine et de mannose (Schwarz et al., 1977; Keil et al., 1979). Plusieurs sites potentiels de glycosylation (5 à 7) sont retrouvés sur les différents sous types de HA et la majorité de ces sites se retrouvent sur la portion HA1. Des analyses de séquences révèlent une grande variabilité autant pour le nombre que pour la localisation de ces sites de glycosylation parmi les différents sous types de HA. Toutefois, deux sites potentiels sont hautement conservés soit Asn-12 et Asn-478 et le site Asn-28 est semi conservé puisqu'il est absent chez les sous types H4, H8, H9 et H12 (Roberts et al., 1993). Les deux types d'oligosaccharides (I et II) se retrouvent chez la HA, cependant, le type II prédomine à 70% (Arbatsky et al., 1988). Les oligosaccharides présents à des sites variables présentent des propriétés antigéniques (Skehel et al., 1984), ils jouent un rôle dans l'attachement du virus à la cellule (Robertson et al., 1987) et seraient aussi impliqués au moment du clivage protéolytique de la protéine (Kawaoka et Webster, 1989; Munk et al., 1992). Quant aux oligosaccharides présents à des sites conservés, il semble qu'ils permettent aux molécules de HA monomères de s'assembler adéquatement, ils empêchent l'agrégation de la

protéine et la protègent contre la dégradation (Wilson *et al.*, 1981; Wiley et Skehel, 1987).

La structure tridimensionnelle de la HA a été déterminé à l'aide de la cristallographie et de la diffraction aux rayons X à trois dimensions (figure 3a). La HA est composée de deux régions distinctes soit une région globulaire et une région tubulaire. La région globulaire ne comprend que les résidus HA1 et elle est formée de huit feuillets β anti-parallèles. Cette région qui a un diamètre d'environ 40 Å, supporte le site de liaison au récepteur ainsi que les différents sites antigéniques. Elle est connectée à la région tubulaire par deux chaînes anti-parallèles (Wilson *et al.*, 1981). La région tubulaire quant à elle se compose de deux hélices α . Elle fait environ 76 Å de longueur et se compose des portions HA1 et HA2. La forme trimérique de la protéine, présentée à la figure 3b, est maintenue par des forces de van der Waals qui interviennent au niveau de la région tubulaire. Les hélices de chacun des monomères s'enroulent les unes autour des autres en une super hélice à main gauche exposant de cette façon leur portion hydrophobe les unes vers les autres (Wilson et Cox, 1990). La forme trimérique permet alors à la protéine d'acquérir une plus grande rigidité et une plus grande stabilité. L'ancrage de la protéine dans la membrane virale se fait par la portion C-terminale de HA2. Une portion

Figure 3. Structure tertiaire de la HA et arrangement trimérique.
(d'après Wilson et al., 1981)

La structure tertiaire de la HA (modifiée à l'aide du logiciel "MS Paint Brush") est présentée en **a**. La région globulaire (région 1) repose sur la région tubulaire (région 2). Ces régions sont composées de feuillets β dont les brins sont représentés par les flèches bleues et d'hélices α (cylindres rouges). Les portions N-terminales de HA1 et HA2 ainsi que la portion C-terminale de HA2 sont au niveau de la région tubulaire. La figure **b** présente la HA trimérique (135 Å de longueur) ancrée à la membrane virale. Les sites antigéniques (site Ac) et les sites récepteurs sont présents dans la région globulaire tandis que les oligosaccharides (Cho) sont présents au niveau des deux régions.



hydrophobe de 26 résidus, située entre les résidus 185 et 210, traverse la membrane alors qu'une petite portion hydrophilique de 11 résidus, située entre les résidus 211 et 221, se situe à la surface interne de la membrane (Bullough et al., 1994; Wilson et Cox, 1990; Ward, 1981).

2.3 Sites antigéniques

Les sites antigéniques définissent les régions immunodominantes qui réagissent avec les anticorps sans qu'il y ait une altération conformationnelle de la protéine. Ils sont situés exclusivement au niveau de la région globulaire de la protéine puisque celle-ci se trouve plus exposée à la surface de la particule virale. Le nombre et la nature de ces déterminants antigéniques sont encore l'objet de controverses. Toutefois, quatre de ces sites, A, B, C et D ont été identifiés sur la structure tridimensionnelle de la HA chez le virus influenza humain H3N2 (Laver et al., 1981; Wiley et al., 1981; Concannon et al., 1984a). Wiley et al., (1981) suggèrent également la présence d'un cinquième site, E. Quant au sous type H1N1, quatre déterminants antigéniques ont été identifiés, soit les sites S_a et S_b qui sont spécifiques aux souches virales et les sites C_a et C_b qui correspondent aux sites communs à plusieurs souches. (Wilson et Cox, 1990). Selon Wiley et Skehel (1987), les nouvelles souches responsables d'épidémies doivent

contenir au moins une substitution d'acides aminés dans deux ou plus de ces sites.

2.4 Fonctions

L'hémagglutinine est responsable de l'attachement du virus aux récepteurs de la cellule hôte permettant ainsi d'initier la première étape de l'infection. Les sites reconnus par la protéine sont composés de résidus d'acide sialique plus particulièrement l'acide *N*-acétyl-neuraminique α 2-3 ou α 2-6 galactose (Rogers et al., 1983). Le site de liaison du récepteur de la protéine se présente comme une dépression logée à la portion distale de la molécule. Il se compose des résidus Tyr 98, Trp 153, His 183, Gln 190, Leu 194 et Tyr 195 qui sont hautement conservés chez les souches d'influenza A et B (Wilson et Cox, 1990; Wiley et Skehel, 1987). D'autres résidus conservés, Cys 97, Pro 99, Cys 139, Pro 147, Tyr 195 et Arg 229, qui sont à proximité, stabilisent la structure du site sans pour autant interagir avec les récepteurs cellulaires (Wiley et Skehel, 1987).

L'entrée du virus dans la cellule ainsi que la fusion des membranes virales et endosomales sont aussi médiées par l'action de la HA. Le virus entre dans la cellule par endocytose, où dans des conditions acides (pH 5.0-5.5), le potentiel fusiogénique de HA est activé (Bullough et al., 1994;

Wilson et Cox, 1990; Wiley et Skehel, 1987). La fusion des membranes est rendue possible lorsque la HA est clivée en HA1 et HA2. Le clivage de la protéine permet alors la libération d'un peptide à l'extrémité N-terminale de HA2, appelé peptide de fusion, qui adhérerait aux membranes permettant ainsi la fusion de celles-ci (Yu et al., 1994; Carr et Kim, 1994).

Enfin, la protéine HA est responsable de l'induction de la réponse immunitaire humorale protectrice. Les anticorps qui neutralisent l'infectivité du virus influenza sont dirigés contre ses déterminants antigéniques (Wilson et Cox, 1990). Toutefois, les variations que subit la HA au niveau de ses déterminants antigéniques permettent par le fait même au virus d'échapper à ces anticorps neutralisants et de poursuivre l'infection (Wiley et Skehel, 1987).

3.0 La neuraminidase

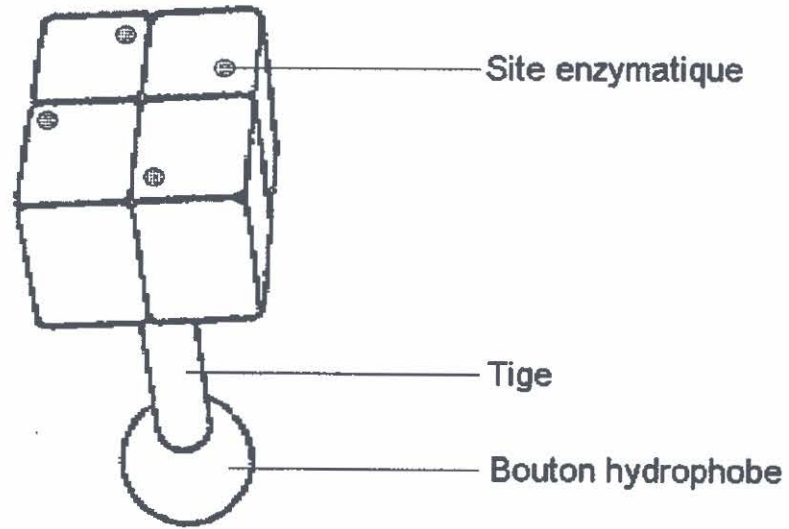
3.1 Caractères généraux

La neuraminidase est une glycoprotéine de surface codée par le segment six du génome viral. Distribuée en amas, elle représente approximativement 10 à 20% des projections de surface dont 5 à 10% de la masse protéique totale du virus (McCauley et Mahy, 1983). Des études de microscopie électronique montrent que la NA a la forme d'un champignon dont la tête de 100 Å x 100 Å x 60 Å est montée sur une tige de 15 Å de largeur par 100 Å de longueur. La longueur de la tige peut cependant varier selon le sous type (Colman et Ward, 1985). À la base de la tige il y a un bouton hydrophobe qui cause l'agrégation de la protéine purifiée en l'absence de détergents (Laver et Valentine, 1969). La NA est présente à la surface du virus sous la forme d'un tétramère (figure 4a) dont la masse moléculaire est estimée à 240 kDa soit, quatre sous unités identiques de 55 kDa (figure 4b) liées par des ponts disulfures et montées sur la tige qui représente environ 17% de la structure protéique (Lamb, 1989; Colman et Ward, 1985; Laver, 1978). La NA est synthétisée en un unique polypeptide qui ne subit que quelques modifications post-traductionnelles: (1) la glycosylation qui se fait dans le reticulum endoplasmique rugueux par des glycosyltransférases cellulaires et (2) l'association des monomères pour former le tétramère. Contrairement à la HA, la NA ne subit aucun clivage

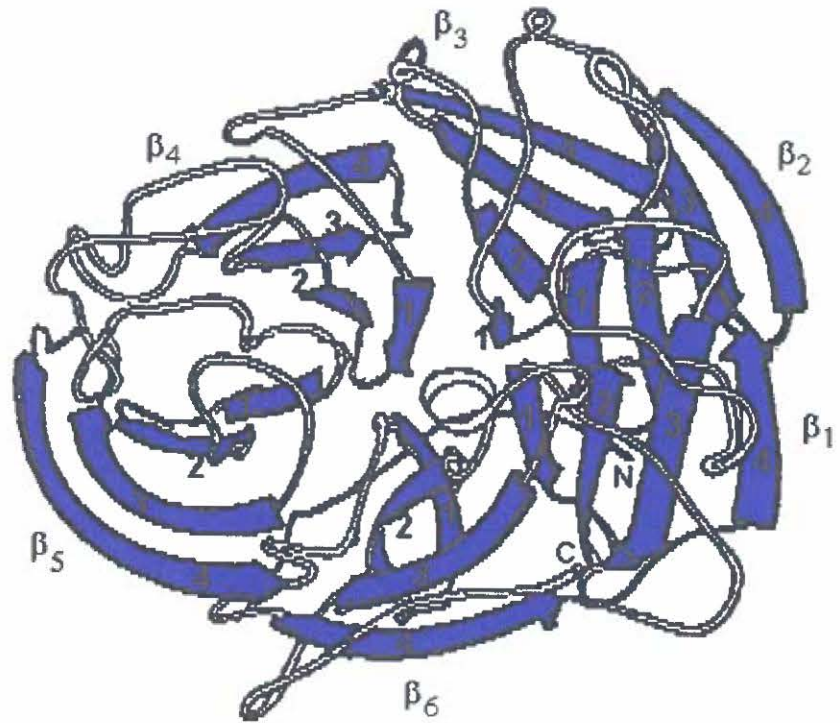
Figure 4. Structure de la neuraminidase.
(d'après Murphy et Webster, 1990; Varghese et al., 1983)

La NA sous forme tétramérique (tracée à l'aide du logiciel "MS Paint Brush") est présenté en **a**. Les quatre monomères de NA sont maintenus par des ponts disulfures et montés sur une tige au bout de laquelle il y a le bouton hydrophobe qui permet l'ancrage dans la membrane virale. Les sites enzymatiques sont présents sur chacun des monomères. Un monomère de NA (modifié à l'aide du logiciel "MS Paint Brush") est présenté en **b**. Les six feuillets β ($\beta 1$ à $\beta 6$) sont composés chacun de quatre brins (flèches bleues numérotées 1 à 4). Le brin le plus près du centre de la sous unité à le numéro 1 tandis que le plus éloigné à le numéro 4. Les extrémités C- et N-terminales sont également identifiées.

a



b



protéolytique et aucun peptide signal n'est prélevé (Colman et Ward, 1985; Blok et al., 1982).

3.2 Structure

Les séquences nucléotidiques de plusieurs sous types de NA sont maintenant connues (Air et al., 1987). Quant à la séquence du sous type N1, celui étudié dans ce projet, le segment fait 1413 nucléotides de long avec une région 5' non codante de 20 nucléotides et une région 3' non codante de 31 nucléotides. La protéine synthétisée à partir de ce gène est composée de 470 résidus d'acide aminés. L'unique portion hydrophobe, située à la base de la tige de la NA, se trouve à la région N-terminale et consiste en 29 résidus, dont 18 résidus hydrophobes et 11 neutres (Lamb et Choppin, 1983) qui sont précédés par six résidus polaires et tous conservés chez tous les sous types (N1 à N9) de NA (Air et al., 1985). Quant au monomères de NA, ils sont maintenus ensemble par des ponts disulfures interchaînes et elle possède aussi plusieurs ponts intrachaînes. La NA de sous type N1 possède 19 résidus Cys qui sont impliqués dans les liens disulfures soit 18 dans les liens intrachaînes et un seul, Cys 78, dans la liaison des paires de monomères (Colman et Ward, 1985).

Les oligosaccharides de la NA sont retrouvés sur des résidus Asn et sont maintenus par des liaisons N-glycosidiques. Les études démontrent que les deux types d'oligosaccharides: *N*-acétyllactosamine (type I) et oligomannoside (type II) sont présents sur la protéine et selon les différents sous types, plus de 50% de ces sucres se retrouvent au niveau de la tige (Colman et Ward, 1985). Toutefois, tout comme pour la HA, il y a une grande variabilité autant pour le nombre que pour la localisation des sites de glycosylation chez la NA. Quant au sous type N1 on retrouve cinq sites potentiels de glycosylation aux résidus Asn 44, 58, 73, 131 et 220 (Colman et Ward, 1985; Concannon et al., 1984b). Certains de ces oligosaccharides présentent des propriétés antigéniques et pourraient être impliqués dans l'activité enzymatique de la protéine (Ward et al., 1983; Griffin et al., 1983).

La structure tridimensionnelle de la NA (figure 4b), a été déterminé par des études de diffraction aux rayons X à partir de deux souches de sous type N2 soit, A/Tokyo/3/67 et A/RI/5*/57 (Laver, 1978; Wright et Laver, 1978; Varghese et al., 1983). Le polypeptide se replie en six feuillets β antiparallèles qui sont constitués de quatre brins identiques arrangés en pales d'hélice lorsque la molécule est vue de sa face supérieure (Colman et Ward, 1985). Chaque feuillet β a la topologie d'un "W" et les brins sont numérotés selon leur position. Le brin le plus près du centre de la sous

unité à le numéro 1 tandis que le plus éloigné à le numéro 4. Les brins sont reliés par des boucles de longueur variable qui portent les acides aminés impliqués dans l'activité enzymatique et la variation antigénique (Colman et al., 1983). Quant à la tige, il n'y a aucune données obtenues par diffraction aux rayons X, toutefois, la microscopie électronique montre une structure longue et fibreuse. Des prédictions quant à sa forme suggèrent un repliement en feuillet β parallèles constitués de deux brins et ces chaînes polypeptidiques seraient stabilisées par des liens disulfures (Chothia et al., 1977). L'ancrage de la protéine se fait par la portion N-terminale qui est située au bout de la tige et qui comprend six résidus conservés qui sont suivis par une portion hydrophobe constituant la portion transmembranaire (Colman et Ward, 1985).

3.3 Sites antigéniques

La protéine NA possède des sites antigéniques qui sont variables quant à leur nature, leur nombre et leur localisation. Chez le sous type N2, sept sites pouvant interagir avec les anticorps ont été identifiés aux résidus 153, 197-199, 328-336, 339-347, 367-370, 400-403 et 431-434 (Colman et Ward, 1985). Quant au sous type N1, les mêmes sites sont observés dont un supplémentaire aux résidus 402-411 (Concannon et al., 1984b). Tous ces déterminants antigéniques sont situés à proximité du site catalytique de

la NA. Toutefois, la souche A/R1/5⁺/57 ne posséderait que quatre régions potentiels pour les interactions avec les anticorps dont deux sont situées à proximité du site catalytique (Webster et al., 1984).

3.4 Fonctions

La NA a pour fonction de couper, au niveau du récepteur cellulaire reconnu par la HA, le lien α cétonique qui relie l'acide *N*-acétylneuraminique aux sucres adjacents. La NA possède cette capacité grâce au site catalytique présent sur chacun de ses monomères. Ce site enzymatique se présente comme une dépression à la surface distale de la molécule et il est constitué de résidus conservés parmi les différents sous types (Colman et al., 1983). Le mécanisme par lequel la NA coupe le lien est complexe et peu connu. Lentz et al., (1987) suggèrent que la coupure se fait par un échange de protons et ceux-ci sont par la suite utilisés pour briser le lien glycosidique résultant en la libération des sucres.

Cette propriété enzymatique que possède la NA, permet d'empêcher l'agrégation des particules virales. Ce phénomène facilite ainsi la libération des virions de la cellule infectée permettant l'infection subséquente d'autres cellules (Liu et al., 1995; Griffin et al., 1983; Palese et al., 1974). Par ailleurs, la NA aiderait au transport du virus à travers le tractus respiratoire

en réduisant la viscosité de la mucine permettant ainsi l'infection (Colman et Ward, 1985). Cette fonction de la NA reste toutefois ambiguë puisque Liu et al., (1995), suggèrent que la NA ne joue pas de rôle critique dans le transport à travers le tractus respiratoire même si l'infection, avec un virus déficient en NA, est moins productive. Finalement, la fonction d'héماغglutination peut être aussi associée à certains sous types de NA puisque les sous type N2 et N9 possèdent une activité héماغglutinante (Arora et Gabriel, 1986; Laver et al., 1984).

4.0 Mécanismes de défense contre le virus influenza

La réponse d'un hôte contre le virus influenza est un processus compliqué impliquant les mécanismes immunitaires non spécifiques et spécifiques. L'importance de l'immunité non spécifique contre une infection à l'influenza a été démontrée. L'administration de virus inactivé ou de virus traité par un détergent stimule, chez la souris, les premières lignes de défense, offrant par le fait même une protection contre une infection expérimentale (Arora, 1993). Ces premières lignes de défenses rencontrées par le virus au moment de son entrée dans l'organisme sont représentées par les macrophages, les PMNL et les cellules "natural killer" (NK) (Ada et Jones, 1986; Fujisawa et al., 1987; Mak et al., 1983). La production de réactifs oxygénés par les PMNL et les macrophages ainsi que l'augmentation d'activité cytotoxique des NK mis en présence du virus influenza a été démontré (Arora et Henrichon, 1994; Arora et Houde, 1991; Arora et al., 1984) Les PMNL sont l'objet de cette étude et seront décrits plus en détails dans la section 4.1.

L'immunité spécifique joue également un rôle important dans la défense contre une infection à l'influenza. Les cellules présentatrices d'antigènes, tels que les macrophages, présentent des fragments d'antigènes aux lymphocytes T entraînant ainsi la prolifération des T

auxiliaires et cytotoxiques. Les T auxiliaires contribuent par la suite à aider les cellules B à fabriquer les anticorps (Roitt et al., 1989). Une infection à l'influenza induit chez l'hôte la synthèse d'anticorps dirigés contre la HA, la NA et la M. La protéine HA est cependant la cible majeure de la réponse humorale protectrice (Wilson et Cox, 1990). Les anticorps neutralisants sont dirigés contre la sous unité HA1 de la protéine et bloquent l'adhésion du virus aux récepteurs cellulaires ainsi que la transcription de l'ARN viral (Possee et al., 1982). Les anticorps dirigés contre la NA peuvent également neutraliser l'infectivité, toutefois, la concentration en anticorps anti-NA doit être élevée pour être efficace. Ces anticorps anti-NA agissent en inhibant la libération du virus de la cellule hôte (Ada et Jones, 1986). Des anticorps anti-M sont aussi produits au cours d'une infection. Splepushkin et al., (1995) ont démontré que la vaccination des souris avec une protéine M recombinante offre une protection contre une infection létale. Le mécanisme par lequel ces anticorps protègent contre l'infection est cependant inconnu. La réponse à médiation cellulaire est également importante contre une infection à l'influenza et la protéine HA en est sa cible majeure. Les deux sous unités, HA1 et HA2, contribuent au développement des T cytotoxiques et ceux-ci limitent la dissémination du virus par la lyse des cellules infectées. (Gould et al., 1987). Les protéines NA et M sont également des cibles pour la réponse cellulaire. Toutefois, leur contribution au

développement des lymphocytes T cytotoxiques est inconnue (Matsui et al., 1995; Wysockam et al., 1994).

4.1 Neutrophiles

4.1.1 Caractères généraux

Les neutrophiles aussi appelés PMNL, font partie de la classe des granulocytes. Ils sont caractérisés par des granulations cytoplasmiques et un noyau unique plurilobé. Les neutrophiles sont les plus nombreux des leucocytes, ils représentent 40 à 75% des leucocytes circulants (Roitt et al., 1989). Ils sont également trouvés à l'extérieur du système vasculaire. Dans le sang ils sont répartis en deux secteurs: un secteur circulant et un secteur marginal de cellules adhérant aux parois des vaisseaux. D'un diamètre de 10 à 20 μm , ils sont composés d'un noyau pouvant avoir jusqu'à cinq lobes réunis par des filaments de matériel nucléaire. Les neutrophiles présentent deux types majeurs de granules: les granules azurophiles primaires qui contiennent des hydrolases acides, de la myéloperoxydase (MPO) et de la muranidase et les granules secondaires ou spécifiques qui contiennent en plus du lysosyme de la lactoferrine (Wheater et al., 1988).

Le développement et la différenciation des granulocytes ou granulopoïèse débute dans la moelle osseuse à partir de cellules souches

déterminées. Le myéloblaste est le premier stade différencié de la granulopoïèse et il donne naissance au promyélocyte qui est caractérisé par des granulations azurophiles primaires. À partir du stade promyélocyte, la quantité de granulations primaires décroît progressivement tandis qu'augmente la proportion de granulations spécifiques secondaires. Le promyélocyte passe ensuite par les phases de myélocyte et métamyélocyte pour devenir neutrophile non segmenté. Ce dernier est le précurseur immédiat du neutrophile à noyau plurilobé (neutrophile mature) et il possède un noyau irrégulier en fer à cheval ou en anneau. Le temps de maturation du neutrophile est de 6 à 9 jours et la durée de vie du neutrophile mature circulant est de 6 heures à quelques jours (Wheater et al.,1988). La croissance des granulocytes est favorisée par plusieurs cytokines: les facteurs de stimulation de colonies des granulocytes, ("granulocyte colony stimulating factor", G-CSF), les facteurs de stimulation de colonies des granulocytes et des macrophages, ("granulocyte-macrophage colony stimulating factor", GM-CSF) et interleukine-3 (IL-3) (Roitt et al., 1989).

Les neutrophiles matures possèdent à leur surface plus de 40 différents marqueurs impliqués dans les fonctions d'adhésion, de chimiotactisme de phagocytose et dans l'activation du métabolisme

oxydatif. Certains antigènes, tels que les molécules de classe II du complexe majeur d'histocompatibilité sont perdus au cours de la différenciation. Quant aux marqueurs retenus par les phagocytes matures, on dénombre entre autres les "cluster designation 16" (CD16) et CD32, qui sont des récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines et des récepteurs liant diverses composantes du complément, soit les récepteurs CR1 et CR3 qui jouent un rôle dans le chimiotactisme, l'adhésion et la phagocytose (Roitt et al., 1989). Des marqueurs additionnels, tels le "leukocyte function antigen-1" (LFA-1) et le p150,95 ont été identifiés à la surface des neutrophiles et sont aussi impliqués dans le phénomène d'adhésion (Rotrosen et Gallin, 1987). La PKC, qui sera décrite plus en détails dans une section suivante, est un autre récepteur présent chez les neutrophiles. Activée de façon exogène par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) et de façon endogène par les DAG, cette protéine joue un rôle important dans l'activation du métabolisme oxydatif en plus de jouer un rôle critique dans la transduction de plusieurs autres signaux (Wenzel-Seifert et al., 1994; Tauber, 1987).

4.1.2 Activation des neutrophiles et métabolisme oxydatif

Les neutrophiles libérés de la moelle osseuse circulent dans le sang où ils se retrouvent en présence de diverses substances chimiotactiques

pouvant les activer. Sous l'effet d'un phénomène de chimiotactisme, les neutrophiles activés sont les premières cellules phagocytaires s'accumulant dans les tissus affectés lors d'une inflammation. Au moment de la réaction inflammatoire, le neutrophile peut mettre en marche ses fonctions effectrices pour une période de un à deux jours leur permettant ainsi de détruire divers agents pathogènes voir même des tumeurs. (Hartshorn et al., 1990).

La fonction primordiale du neutrophile est la phagocytose. Cette activité caractérisée par l'adhésion, l'ingestion et éventuellement la digestion de particules constitue l'élément essentiel de la réaction inflammatoire. La phagocytose peut être dépendante ou indépendante d'un récepteur spécifique. La cellule enveloppe la particule à détruire et l'initiation de ce phénomène mène à la fusion des granules avec le phagosome pour former éventuellement le phagolysosome. Le pH acide du phagolysosome, l'activité des protéases et acides hydrolases permettent la destruction du pathogène (Roitt et al., 1989).

Le métabolisme oxydatif du neutrophile, amorcé durant la phagocytose, participe également à la destruction des pathogènes (Yamamoto et al., 1989). Il résulte en la génération d'oxydants suite à

l'activation d'une enzyme membranaire, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase. Au cours de la réaction, la NADPH oxydase agit à titre de donneur d'électron permettant la réduction de l'oxygène en anion superoxyde (O_2^-) qui sera converti par la superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Downey, et al., 1995; Tauber, 1987). Lors d'une infection, ces agents oxydants sont responsables des dommages induits aux agents pathogènes mais également aux tissus environnants. D'autres réactifs oxygénés, tels que les radicaux hydroxyles (OH) et les halogènes oxydants (HOCl/OCl⁻) sont produits suite à une interaction du H_2O_2 avec la MPO. Ces produits sont aussi importants dans les réactions cytotoxiques (Watson et al., 1991) (figure 5). L'importance d'un tel système chez le phagocyte est démontré par une maladie héréditaire chronique qui est le résultat d'une déficience de la NADPH oxydase. Chez le patient atteint, la NADPH oxydase ne génère pas de réactifs oxygénés ayant pour résultats des infections récurrentes pouvant être mortelles (Maly et Schürer-Maly, 1995; Tauber, 1987).

4.1.3 Neutrophiles et virus influenza

Les neutrophiles ont une interaction complexe et cliniquement pertinente avec le virus influenza. Suite à une infection expérimentale par le virus, les neutrophiles sont les premières cellules à se présenter au

Figure 5. Réactions du métabolisme oxydatif.

La NADPH oxydase est le donneur d'électron qui permet la réduction de l'oxygène en O_2^- . L'action de la superoxyde dismutase provoquera la conversion de l' O_2^- en H_2O_2 et ce dernier interagit avec la MPO pour former des produits tels que le HOCL, le OCL^- et l' OH^- .

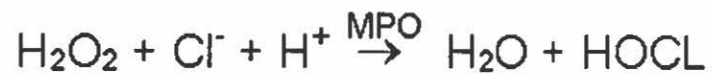
1) Réduction de l'oxygène en O_2^- .



2) Conversion de l' O_2^- en H_2O_2 par la superoxyde dismutase.



3) Interaction du H_2O_2 avec la MPO.



niveau du site inflammatoire et elles jouent un rôle important dans la guérison de l'hôte (Yamamoto et al., 1989; Fujisawa et al., 1987; Tsuru et al., 1987). Par ailleurs, plusieurs travaux démontrent également que le virus grippal peut altérer les activités de défense des neutrophiles, prédisposant ainsi l'hôte à des infections bactériennes secondaires (Hartshorn et al., 1995; 1988; Abramson et Mills, 1988; Abramson et al., 1982).

Afin de déterminer plus précisément le rôle des neutrophiles lors d'une infection grippale, Yamamoto et al., (1989) ont étudié l'interaction entre les PMNL humains et le virus influenza par microscopie électronique. Ils ont démontré que le virus se lie au neutrophile dans un ratio de 1000 particules virales par cellule. La liaison est sensible à l'action de la NA, suggérant une liaison à des récepteurs d'acide sialique. Le virus disparaît ensuite de la surface des cellules, où il est probablement phagocyté.

L'activation du neutrophile est caractérisée par le métabolisme oxydatif. L'effet du virus influenza ou de ses glycoprotéines purifiées sur l'activité du métabolisme oxydatif des neutrophiles a été particulièrement étudié. Selon Hartshorn et al., (1992b), le virus active la NADPH oxydase, il y a production de H_2O_2 mais aucune production d' O_2^- n'est observée. Contrairement, Arora et Henrichon (1994), ont démontré que les

glycoprotéines HA et NA purifiées et la protéine M qui est non glycosylée provoquent, chez les neutrophiles, une augmentation significative d'O₂⁻ par rapport aux cellules témoins.

La réponse des neutrophiles face au virus influenza a été comparée à la réponse de ces cellules face au N-formyl-méthionyl-leucyl-phénylalanine (FMLP). L'effet du FMLP chez les neutrophiles est aujourd'hui bien caractérisée et l'équipe de Hartshorn et al., (1992b) conclue que le mécanisme de transduction utilisé par le virus pour activer la NADPH oxydase des neutrophiles est similaire à celui utilisé par le FMLP. Suite à l'interaction du virus avec un récepteur cellulaire, il y a activation de la phospholipase C (PLC). Au moment où elle est active, la PLC provoque la génération de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et du DAG. Ces produits sont respectivement responsables de la libération du calcium intracellulaire et de l'activation de la PKC. Finalement, l'activation de la PKC résulte en la phosphorylation d'une composante de la NADPH oxydase permettant alors à cette dernière de s'activer et de produire des radicaux oxygénés qui seront dommageables pour les pathogènes (Curnutte et al., 1994; et Verhoeven et al., 1993). De plus, l'équipe de Hartshorn (1992b) a également démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de la PKC, diminue la production de H₂O₂ induite par le virus ou le FMLP, confirmant par le fait

même le rôle crucial que joue la PKC dans l'activation des neutrophiles par le virus influenza. Les protéines virales qui sont responsables d'activer ces différents éléments du mécanisme de transduction sont inconnues. Toutefois, les glycoprotéines de surface du virus pourraient être les cibles de choix. Il a été démontré par Rott et al., (1995) que la HA a le potentiel d'activer la PKC chez les lymphocytes B.

Non seulement le virus grippal active les neutrophiles, mais il est aussi responsable de la perturbation des fonctions chimiotactiques, phagocytaires et anti-bactériennes de ces cellules (Hartshorn et al., 1996; 1995; 1992a; Abramson et al., 1991; Cassidy et al., 1989). Le mécanisme par lequel le virus déprime les neutrophiles n'est pas clairement identifié. Toutefois, il semble que le virus active les neutrophiles initialement à une dépression (Hartshorn et Tauber 1989). De plus, Cassidy et al., (1989), proposent un rôle pour la HA dans le mécanisme de dépression des neutrophiles. L'attachement de la protéine au récepteurs d'acide sialique serait en partie responsable de la dépression alors que l'activité de fusion ne serait pas requise. Plus récemment, Hartshorn et al., (1995), ont démontré que la dépression des cellules serait dépendante du récepteur cellulaire utilisé par le virus. La liaison du virus au CD43, provoquerait également la dépression des neutrophiles.

Divers agents sont cependant reconnus pour éviter la dépression des neutrophiles par le virus grippal. Les cellules mises en présence de produits, tels que le GM-CSF, le guanosine triphosphate et le 1-oléoyl-2-acétylglycérol génèrent une réponse positive contre le virus influenza (Abramson et al., 1991). Le surfactant pulmonaire, associé à une lectine, a la propriété d'augmenter la liaison des neutrophiles au virus et l'activation du métabolisme oxydatif contre le virus en plus de diminuer le phénomène de dépression (Hartshorn et al., 1994; 1996).

5.0 Transduction des signaux chez les phagocytes

Les neutrophiles répondent aux signaux extracellulaires auxquels ils sont soumis en activant leur diverses fonctions. La phosphorylation de protéines, catalysée par les protéines kinases, est reconnue comme un procédé majeur dans la régulation des fonctions cellulaires. Chez les mammifères, plus de 100 kinases sont connues pour leurs différents rôles physiologiques (Goldsmith et Cobb, 1994). Dans le cadre de ce projet, le type de kinase étudié est la PKC. Cette protéine joue un rôle crucial dans la transduction des signaux extracellulaires. Elle se retrouve dans les fractions cytosolique et membranaire des neutrophiles et la phosphorylation de protéines via la PKC joue un rôle important dans l'activation de ces phagocytes (Wenzel-Seifert et al., 1994; Phillips et al., 1992; Hartshorn et al., 1992b; Tauber, 1987).

La PKC est le récepteur majeur des phorbols esters qui sont connus pour activer les neutrophiles. L'activation des phagocytes par de tels agents, mène à un spectre de réponse, incluant l'agrégation, la dégranulation de granules spécifiques et la stimulation du métabolisme oxydatif (Tauber, 1987). Les mécanismes moléculaires par lesquels la PKC peut médier de telles réponses ne sont pas tous bien connus. Cependant, il est clair que la PKC joue un rôle important dans la transduction des

signaux, qui résultent en un mécanisme de défense ou en une réponse immunitaire, chez les cellules phagocytaires (Aderem, 1992).

5.1 La protéine kinase C

5.1.1 Caractères généraux

La PKC a été identifiée pour la première fois dans le cerveau de rat au cours des années 1970 comme une sérine/thréonine protéine kinase (Stabel, 1990). Aujourd'hui, cette enzyme est associée à tout le règne animal et elle joue un rôle important dans la transduction d'une large variété de signaux cellulaires. Elle est impliquée directement ou indirectement dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire, dans le contrôle de diverses réponses immunitaires et au niveau des communications intra et inter-celullaires (Buchner, 1995; Kikkawa et al., 1989; Nishizuka, 1989; 1988).

La PKC représente une famille qui comprend au moins 12 isoformes (isoenzymes ou sous-espèces), qui diffèrent par leurs structures et leurs propriétés enzymatiques (Stabel, 1990; Nishizuka, 1988). La famille des PKC est divisée en trois groupes: les cPKC, qui comprennent les isoformes alpha (α), beta I et II ($\beta_{I/II}$) et gamma (γ), les nPKC, composées des

isoformes delta (δ), epsilon (ϵ), èta (η), thêta (θ), et mu (μ) et les aPKC, caractérisées par les isoformes zêta (ζ), iota (ι), et lambda (λ) (Buchner, 1995). Les cPKC sont dépendantes du calcium et sont activées par les DAG, les phorbols esters et la phosphatidylsérine (PS) tandis que les nPKC sont indépendantes du calcium. Quant aux isoformes aPKC, elles sont indépendantes du calcium et ne sont pas activées par les phorbols esters et les DAG. Toutefois, il semble que la PS et le phosphatidylinositol 1,4,5-triphosphate (PIP_3) seraient impliqués dans l'activation de certaines isoformes de ce groupe (Buchner, 1995; Nelsestuen et Bazzi, 1991; Kikkawa *et al.*, 1989).

Les isoformes de PKC proviennent de gènes différents ou sont le produit d'épissage alternatif. Les gènes codant pour les PKC α , β , γ et μ chez l'humain, ont été localisés sur les chromosomes 17, 16, 19 et 21 respectivement (Coussens *et al.*, 1986; Johannes *et al.*, 1994). La localisation chromosomique des autres isoformes reste toujours à déterminer. Les isoformes β I et β II dérivent d'épissage alternatif générant ainsi deux polypeptides qui ne diffèrent que par 50 acides aminés au niveau de la portion C-terminale (Coussens *et al.*, 1987). L'isolement d'ADNc indique que les isoformes ϵ et ζ pourraient aussi être le produit d'épissage alternatif. Les deux isoformes ϵ possibles (ϵ et ϵ_2), diffèrent par leur portion

N-terminale. La PKC ε_2 diffère de l'isoforme ε par un acide aminé à la position 240 qui est remplacé par une séquence représentant un codon d'arrêt. Quant à la PKC ζ deux ADNc ont été isolés et ils codent pour des protéines qui diffèrent par leurs 112 premiers acides aminés (Ono et al., 1988; 1989b).

Ces protéines, se retrouvent dans plusieurs types de cellules et une même cellule peut exprimer plusieurs isoformes dans des ratios variables. La distribution intracellulaire de l'enzyme dépend de l'état d'activation de la cellule (Kikkawa et al., 1989). Au niveau des tissus, les isoformes α , β , δ , ε et ζ sont ubiquitaires dans le cerveau, les poumons, la rate, le thymus et la peau (Hug et Sarre, 1993; Kikkawa et al., 1989, Ono et al., 1989b; Nishizuka, 1988) tandis que la PKC γ se retrouve exclusivement dans le système nerveux central (Nishizuka, 1988). La PKC η est fortement exprimée dans les poumons (Bacher et al., 1991; Osada et al., 1990), l'isoforme θ est prédominant dans les muscles (Osada et al., 1992) et l'isoforme λ est retrouvé dans les ovaires et les testicules (Nishizuka, 1992). Quant aux isoformes ι et μ , ils sont exprimés respectivement dans le pancréas et les reins (Johannes et al., 1995; 1994; Selbie et al., 1993). Les phagocytes étudiés dans ce projet expriment les PKC α , β , ainsi que les

isoformes du groupe des nPKC (Wenzel-Seifert et al., 1994; Devalia et al., 1992). Le tableau II résume les caractéristiques des trois groupes de PKC.

5.1.2 Structure

La PKC est composée d'une seule chaîne polypeptidique avec une masse moléculaire variant entre 67 et 84 kDa pour la plupart des isoformes à l'exception de la sous-espèce μ qui a une masse de 115 kDa (Johannes et al., 1994; Hug et Sarre, 1993). La comparaison des séquences d'acides aminés des isoformes de PKC démontre la présence de régions hautement conservées parmi les sous-espèces (Nelsestuen et Bazzi, 1991). Les quatre régions conservées (C1-C4), sont en alternance avec cinq régions variables (V1-V5), composant ainsi le domaine régulateur en position N-terminale et le domaine catalytique en position C-terminale qui sont séparés par la région V3 (figure 6) (Kikkawa et al., 1989; Nishizuka, 1988).

La région V1 des cPKC est composée d'une séquence en position 19 à 36 qui ressemble à un site de phosphorylation d'un substrat nommé le pseudosubstrat prototope (Stabel et Parker, 1991). Cette séquence, serait responsable de contrôler l'activité de la PKC, en inhibant l'autophosphorylation et la phosphorylation de substrats, maintenant ainsi

Tableau II. Caractéristiques des isoformes de la PKC.
(d'après Nishizuka, 1995; Hug et Sarre, 1993)

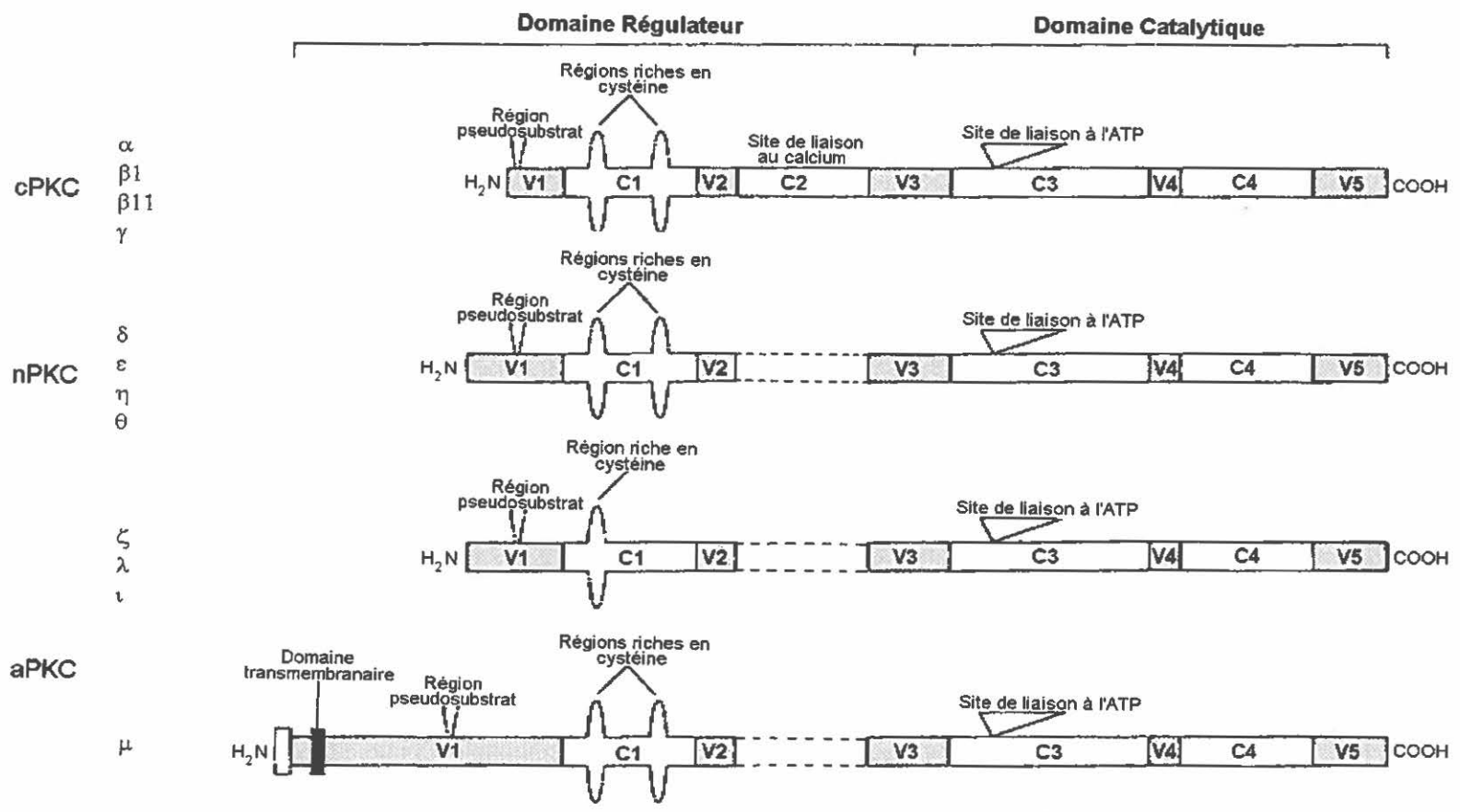
Groupes	Isoformes	Masse moléculaire (kDa)	Activation	Chromosome	Distribution
cPKC	α	76	phorbol ester DAG, PS, calcium	17	cerveau, poumons, rate, peau, thymus
	β I	77	phorbol ester DAG, PS, calcium	16	cerveau, poumons, rate, peau, thymus
	β II	77	phorbol ester DAG, PS, calcium	16	cerveau, poumons, rate, peau, thymus
	γ	78	phorbol ester DAG, PS, calcium	19	cerveau, moelle épineière
nPKC	δ	78	phorbol ester DAG, PS	inconnu	cerveau, poumons, rate, peau, thymus
	ϵ	84	phorbol ester DAG, PS	inconnu	cerveau, poumons, rate, peau, thymus
	η	78	phorbol ester DAG, PS	inconnu	poumons

Tableau II. (suite)

Groupes	Isoformes	Masse moléculaire (kDa)	Activation	Chromosome	Distribution
	θ	81	inconnue	inconnu	muscles
aPKC	ζ	68	PS, PIP ₃	inconnu	cerveau, poumons, rate, peau, thymus,
	λ	67	inconnue	inconnu	ovaires, testicules
	ι	67	inconnue	inconnu	pancréas
	μ	115	inconnue	inconnu	reins

Figure 6. Organisation des diverses régions retrouvées chez les trois groupes de PKC.
(d'après Karaszkiewicz et al., 1996)

Les trois familles de PKC sont représentées par cette figure. La comparaison des séquences d'acides aminés démontre la présence de régions conservées et variables. Les quatre régions conservées (C1-C4) sont en alternance avec les cinq régions variables (V1-V5) composant ainsi le domaine régulateur en position N-terminale et le domaine catalytique en position C-terminale. Les η et α PKC sont dépourvues de la région C2 où se trouve le site de liaison au calcium. La séquence pseudosubstrat prototype, les régions riches en cystéines et le site de liaison à l'ATP se retrouvent dans les régions V1, C1 et C3 respectivement.



l'enzyme dans un état inactif en l'absence d'activateurs (House et Kemp, 1987). Les nPKC et les aPKC ont une région V1 plus longue qui possède les mêmes caractéristiques que la région V1 des cPKC. De plus, la PKC μ contient en région V1 un domaine transmembranaire (Johannes et al., 1994).

La région C1 des isoformes contient des séquences répétées en tandem riches en résidus Cys similaires à des doigts de zinc. Chacun des isoformes contiennent deux de ces motifs à l'exception des sous espèce ζ , ι et λ qui n'en contiennent qu'un seul (Nishizuka, 1992; Stabel et Parker, 1991). De telles structures permettent généralement des interactions ADN/protéines, ARN/protéines et protéines/protéines. Toutefois, des interactions de la sorte avec les différentes isoformes n'ont pas été rapportées. Il est clair cependant, que ces séquences riches en résidus Cys, sont responsables de l'interaction entre les PKC et les DAG ou les phorbols esters (Ono et al., 1989a). Les PKC ζ , ι et λ , qui ne se lient pas aux DAG ou aux phorbols esters, suggèrent que la délétion d'un de ces motifs interfère dans la liaison avec ces produits (Stabel et Parker, 1991).

Les n et les aPKC sont indépendantes du calcium et sont dépourvues de la région C2, suggérant ainsi un rôle de liaison avec le calcium pour

cette région constante, présente uniquement chez les cPKC. Aucun des motifs de séquences connus pour se lier au calcium n'ont été identifiés en région C2. Cependant, cette portion constante comprend tout de même plusieurs acides aminés qui sont soupçonnés de participer dans la liaison de la protéine avec le calcium. Des études de mutagenèse dirigée, supportent le fait que cette région joue un rôle dans la liaison avec calcium, puisqu'une délétion de la portion C2, rend la protéine indépendante du calcium pour son activation (Ono et al., 1989a). Cette région qui interagit avec les phospholipides de façon dépendante du calcium, est aussi impliquée dans la translocation de l'enzyme, du cytosol à la membrane cellulaire, lorsque les concentrations de calcium sont augmentées (Nishizuka, 1995).

Les isoformes identifiés jusqu'à maintenant possèdent toutes la région V3. Cette dernière, qui suit la région C2, sépare le domaine catalytique du domaine régulateur. La portion V3 est sensible au clivage protéolytique par la trypsine et par des protéases dépendantes du calcium telles que les enzymes calpain I et II (Huang et Huang, 1986; Kishimoto et al., 1983). La PKC α est cependant plus résistante à la digestion protéolytique que les autres sous-espèces (Kochs et al., 1993).

La région C3 contient un site de liaison à l'ATP dont le motif X-Gly-Gly-X-Gly-X₂-Gly-X₁₆-Lys-X, se trouve conservé parmi toutes les sous-espèces (Kemp et Pearson, 1990). Seule la PKC ζ montre un motif différent, soit un résidu Ala en position 264 qui remplace un résidu Gly. Quant à la région C4, elle contient le site de liaison au substrat et la portion qui permet le transfert des groupements phosphates. Cette dernière, qui est conservée parmi les isoformes, porte la séquence Asp-Gly-Phe à l'exception de la PKC ζ dont le résidu Phe est remplacé par une Tyr. Chez toutes les PKC, le site de liaison au substrat et la région de transfert des groupements phosphates sont séparées par 105 acides aminés (Hug et Sarre, 1993). Quant aux régions V2, V4 et V5, aucune fonction précise ne leur sont attribuées (Coussens *et al.*, 1986).

5.1.3 Activation

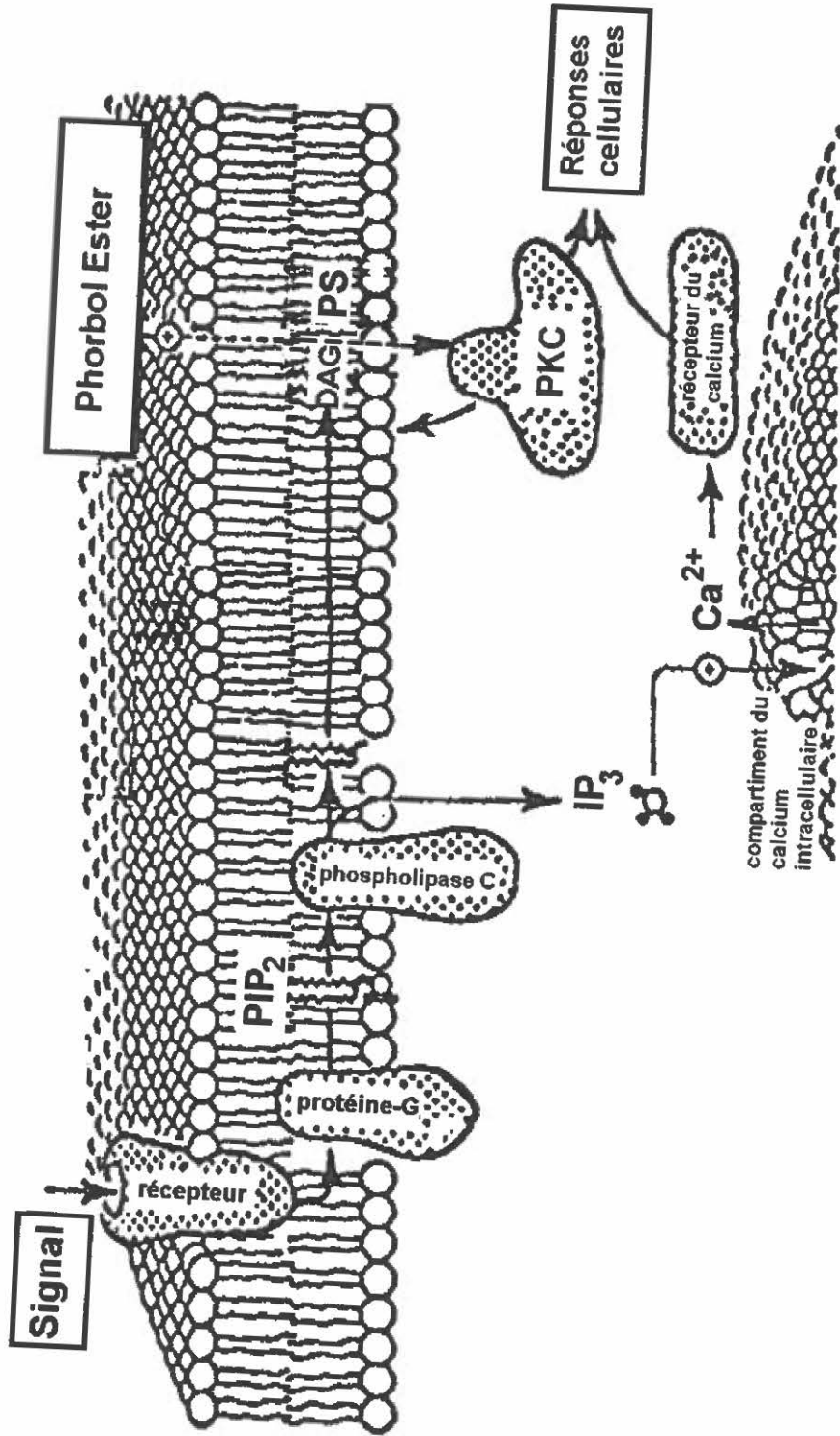
En dépit de recherches intensives, le mécanisme d'activation de la PKC n'est toujours pas très bien décrit. Reconnue il y a quelques années comme une enzyme dépendante du calcium et des phospholipides (Kishimoto *et al.*, 1980; Takai *et al.*, 1979), la PKC démontre aujourd'hui encore plus de complexité du à la découverte des différentes isoformes. Certaines requiert la présence de calcium et des DAG alors que d'autres en sont complètement indépendantes.

Le modèle d'activation le mieux connu est celui des cPKC. Elles requièrent la présence du calcium et des phospholipides et sont activées par les DAG qui sont produits par la route de la PLC (Nishizuka, 1984). Tel que démontré à la figure 7, l'interaction entre un agoniste et un récepteur cellulaire est la première étape de formation des DAG. Cette liaison provoque l'hydrolyse du phosphatidyl inositol 4,5-biphosphate (PIP₂) sous l'action de la PLC, générant ainsi le DAG et l'IP₃ (Nishizuka, 1988). L'IP₃ va provoquer la libération du calcium intracellulaire qui se lie à la région C2 de la protéine, permettant ainsi la translocation de la PKC cytosolique à la membrane cellulaire. Le calcium est aussi nécessaire pour augmenter l'affinité de l'enzyme vis-à-vis la PS. Une fois dans la membrane cellulaire, la PKC est donc en présence du DAG qui l'activera et de la PS qui agit à titre de cofacteur (Nishizuka, 1988). Les phorbols esters, tels que le PMA sont des activateurs de la PKC qui imitent l'action des DAG et ont une structure similaire à ce dernier. En présence de faibles concentrations de calcium et de PS, ils activent directement la PKC (Nishihira et O'flaherty, 1985). Une fois active, la PKC peut donc phosphoryler différentes protéines qui sont impliquées dans diverses réponses cellulaires.

Des études récentes suggèrent plusieurs routes additionnelles qui peuvent fournir le DAG nécessaire à l'activation de plusieurs isoformes de

Figure 7. Modèle d'activation de la PKC.
(adapté de Nishizuka, 1988)

La figure présente la membrane cellulaire ainsi que les protéines membranaires (récepteur, protéine G et PLC). Les diverses composantes impliquées dans les réactions menant à l'activation de la PKC suite à l'interaction d'un agoniste avec un récepteur cellulaire sont le PIP₂, le DAG, l'IP₃, la PS, la PLC, et le Ca²⁺ (calcium). Ce mécanisme d'activation est décrit à la section 5.1.3. La figure montre également la PKC qui est sur le point de s'associer à la membrane. Les phorbols esters peuvent activer directement la PKC suite à une liaison sur un site spécifique de l'enzyme.



PKC. La route de la phospholipase D, qui hydrolyse la phosphatidylcholine, résultant en la production de DAG et la route de la phospholipase A₂ qui hydrolyse l'acide arachidonique (Nishizuka, 1995). De plus, il a été démontré que d'autres produits du métabolisme des glycérolipides peuvent être des activateurs potentiels de la PKC (Kochs et al., 1993). La cardiolipine, l'acide arachidonique et la lipoxine A activent *in vitro* la PKC et le phosphatidylinositol peut remplacer la PS à titre de cofacteur (Hug et Sarre, 1993). Les diverses raisons expliquant la route à suivre et les produits utilisés pour activer la PKC sont toujours inconnus. Cependant, les différents signaux extracellulaires, le type de cellules et le temps après la stimulation cellulaire pourraient être responsables (Farago et Nishizuka, 1990).

Les caractéristiques d'activation des n et aPKC ne sont pas très bien comprises. Les nPKC, qui sont indépendantes du calcium, sont comme les cPKC, activées par les DAG. Il est très probable que le modèle d'activation des nPKC ressemble à celui des cPKC mais leur indépendance au calcium rend difficile la description du phénomène de translocation (Stabel et Parker, 1991). Quant aux aPKC, elles seraient activées par le PIP₃, qui serait aussi le produit responsable de leur translocation du cytosol à la membrane cellulaire (Pears, 1995; Nishizuka, 1995).

L'activation de la PKC est généralement suivie d'un clivage protéolytique de l'enzyme au niveau de la région V3. Le clivage par les protéases résulte en la génération d'un fragment catalytique nommé protéine kinase M et d'un fragment régulateur (Kikkawa et al., 1989). Cette protéolyse serait nécessaire pour la dégradation de l'enzyme évitant ainsi une activation chronique de la PKC (Hug et Sarre, 1993).

5.1.4 Spécificité des substrats

La PKC peut phosphoryler plusieurs substrats *in vitro*, mais il y a peu de substrats identifiés *in vivo*. Plusieurs études ont tenté de déterminer la spécificité de l'enzyme vis-à-vis les substrats. Les peptides caractérisés par un groupe de résidus chargés positivement, qui entourent des résidus Ser et Thr sont considérés comme de bons substrats (Nelsestuen et Bazzi, 1991). Toutefois, des analyses biochimiques révèlent des différences significatives pour la spécificité des substrats selon les diverses isoformes. En particulier, les nPKC démontrent un éventail de substrat réduit *in vitro* puisqu'elles sont incapables de phosphoryler l'histone, un substrat communément utilisé (Pears, 1995). L'utilisation de chimères a démontré que la spécificité pour un substrat se trouve au niveau du domaine régulateur de l'enzyme, particulièrement dans la portion V1. De plus des

analyses détaillées ont révélé un rôle pour le site pseudosubstrat dans la sélection des substrats reconnus par l'enzyme (Dekker et al., 1993).

Des études de marquage *in situ* de cellules traitées par des phorbols esters ont permis d'identifier trois classes de substrats physiologiques: 1) les protéines impliquées dans la transduction des signaux et dans l'activation de la PKC, 2) des protéines impliquées dans la voie métabolique et 3) des protéines impliquées dans des fonctions régulatrices de l'expression des gènes. Il est à noter que d'autres protéines kinases comme la S6 kinase et la Raf kinase font partie des protéines phosphorylées par les diverses sous-espèces de PKC (Hug et Sarre, 1993). L'ADN topoisomérase I (Pommier et al., 1990) et la lamin B (Fields et al., 1988) qui sont des protéines impliquées dans le contrôle de la synthèse de l'ADN sont des substrats reconnus par la PKC, ce qui démontre le rôle que joue la PKC au niveau de la prolifération cellulaire.

Chez les neutrophiles, la phosphorylation de substrats par la PKC mène à l'élaboration de diverses fonctions, entre autres, le chimiotactisme, la phagocytose et le métabolisme oxydatif, (Curnutte et al., 1994; Verhoeven et al., 1993; Sharma et al., 1991). Les substrats qui sont phosphorylés par la PKC et qui mènent à de telles réponses ne sont pas

tous connus. Cependant, l'activation des phagocytes serait le résultat de la phosphorylation d'une kinase riche en résidus Ala nommée "myristoylated alanine-rich C kinase substrate". Elle est la protéine majeure qui est phosphorylée par la PKC lorsque les cellules sont traitées par les phorbol esters. (Aderem, 1992). De plus, il a été démontré qu'une composante de la NADPH oxydase, est phosphorylée par la PKC. La protéine p47-phox, qui contient plusieurs résidus Ser, est phosphorylée suite à un traitement par les phorbol esters, il s'en suit une translocation de la p47-phox du cytosol à la membrane cellulaire et finalement l'activation de la NADPH oxydase (Curnutte et al., 1994; Verhoeven et al., 1993).

MÉTHODOLOGIE

1.0 Préparation du matériel biologique

1.1 Virus

La souche virale A/USSR/90/77 (H1N1) est issue du National Institut of Health, Bethesda, Maryland.

1.2 Culture et purification de la souche virale

1.2.1 Culture

Le virus influenza a été cultivé dans des oeufs de poule embryonnés âgés de 11 jours provenant du couvoir Simetin (St-Canut, Québec, Canada). Sous conditions stériles, un volume de 0,2 mL de la semence virale diluée à 2 HA/mL dans du tampon PBS (annexe 1) a été inoculée par voie chorioallantoïdienne à l'aide d'une seringue 3 cc munie d'une aiguille 23 G (Fisher, Montréal, Québec, Canada). Les oeufs ont été incubés 48 h à 33°C pour ensuite être transférés à 4°C pour 18 h. Le liquide allantoïdien infecté a été récolté sous conditions stériles.

1.2.2 Purification

La méthode employée pour purifier le virus comprend une phase de concentration sur gradient discontinu de saccharose suivie par la purification en 2 étapes toujours sur gradient discontinu de saccharose (Arora et al., 1985).

Le gradient discontinu pour la concentration du virus est formé d'un coussin de 1 mL de saccharose, 50 % (p/p) (Ultra-Pur; Canadian Scientific Products, London, Ontario, Canada) dans un tampon PBS, qui a été déposé au fond d'un tube de polyallomère de 30 mL (Beckman, Toronto, Ontario, Canada) et plongé dans l'azote liquide afin de permettre la congélation de ce premier coussin. Un deuxième coussin de saccharose de 2 mL, préparé à 22 % (p/p) dans un tampon PBS, a été déposé sur le premier coussin et le tout congelé de nouveau dans l'azote liquide. Un volume de 25 mL du liquide allantoïdien infecté a été déposé sur ce gradient discontinu et centrifugé pendant 60 min à 100000 x g à 4°C. Après la centrifugation, le liquide allantoïdien a été prélevé de façon à laisser 1 mL au dessus du gradient pour éviter de perturber ce dernier ainsi que les particules virales. Les tubes contenant le gradient et le virus ont été replongés dans l'azote liquide, 25 mL de liquide allantoïdien infecté y ont été de nouveau déposés et centrifugés tel que décrit précédemment. Ces manipulations ont été répétées 4 à 5 fois jusqu'à épuisement du liquide infecté. Les gradients contenant les culots de virus concentré ont été ensuite rassemblés et conservés à 4°C en vue de la purification.

Avant l'étape de purification, les culots rassemblés ont d'abord été dispersés trois fois à l'aide d'un sonicateur (Sonic dismembrator, Fisher

Scientific, Farmingdale, New York, USA) à une intensité de 30 megahertz/sec, puis clarifiés par centrifugation (centrifugeuse PR-6, IEC, Needham, Mass. USA) 1000 x g pendant 10 min à 4°C. Par la suite, afin de procéder à la première étape de purification, la concentration en saccharose de l'échantillon a été ajustée à 50% (p/p) par l'ajout de saccharose solide et cette suspension a été centrifugée 90 min à une vitesse de 100000 x g à 4 °C. Cette centrifugation a permis de séparer les particules virales qui restent dans le surnageant des différentes particules de densité plus élevée qui se retrouvent au culot. Les surnageants ont ensuite été rassemblés et la concentration de saccharose abaissée à 26% (p/p) par l'ajout de tampon PBS et cette suspension a été centrifugée tel que mentionné plus haut. Cette deuxième étape de purification a permis de récolter le virus au culot tandis que les particules de densité inférieure demeurent dans le surnageant. Les culots de virus ont été resuspendus dans du tampon PBS à pH 7,4 et le dosage protéique ainsi que le titre hémagglutinant ont été effectués. Le virus a été aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à son utilisation.

1.3 Titre de l'activité hémagglutinante

Le titrage de l'activité hémagglutinante a été fait selon la méthode du "WHO collaborating center for reference and research on influenza (1982)".

Dans des plateaux 96 puits à fond conique (Linbro, Flow, Mississauga, Ontario, Canada), un volume de 0,05 mL de PBS a été déposé en laissant la première rangée libre. Par la suite, 0,1 mL de la suspension virale a été déposé dans la première rangée et une dilution en série logarithmique en base deux fut effectuée. Les érythrocytes de coq (0,5% dans du PBS) fraîchement préparés ont finalement été ajoutés à raison de 0,05 mL par puits. La lecture du titre s'est faite après une incubation de 30 min à la température de la pièce. Le titre hémagglutinant (HA/mL) de l'échantillon est la réciproque de la plus haute dilution qui provoque 100% d'hémagglutination.

1.4 Dosage protéique

Les concentrations en protéines des différents échantillons ont été évaluées à l'aide du "BCA protein assay kit" selon les recommandations du manufacturier (Pierce Chemical Company, Rockford, Ill., USA). Un volume de 1 mL du réactif "BCA" (solution A: solution B dans un rapport de 50:1, annexe 1) a été ajouté à 0,1 mL des échantillons à tester et ces derniers ont été incubés 30 min à 60°C. Une courbe standard de 0 à 10 µg effectuée avec l'albumine sérique bovine ("bovine serum albumin", BSA, RIA Grade, Sigma, Montréal, Québec, Canada) comme standard protéique était faite en parallèle. L'absorbance des échantillons a été lue au spectrophotomètre

(Carry (1E) U.V.-Visible Varian, Australie) à une longueur d'onde de 562 nm.

1.5 Purification des protéines virales

Les protéines HA, NA et M du virus influenza A/USSR ont été séparées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la technique décrite par Laemmli (1970). Les protéines ont ensuite été extraites du gel par une électroélution (Donofrio et al., 1986). Cette technique a permis d'obtenir des protéines biologiquement inactives. La HA et la NA ont également été purifiées par une autre méthode permettant de conserver leurs activités biologiques, soit une chromatographie d'affinité sur une colonne de *N*-(*p*-aminophenyl) oxamique acide (NAPOA, Sigma) selon la technique décrite par Arora et Henrichon (1994).

1.5.1 Electrophorèse et conditions électrophorétiques

L'appareil électrophorétique "Protein Cell Slab" (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA., USA) a été utilisé pour la purification des protéines virales selon les recommandations du manufacturier. Un volume de 0,5 mL de tampon d'échantillon (annexe 1) a été ajouté à 5 mg de la suspension virale. Ce mélange a été chauffé 5 min à 100 °C afin de

permettre la dissociation des particules virales puis centrifugé 5 min à 16000 x g à la température de la pièce. L'échantillon a été déposé à l'aide d'une seringue tuberculine munie d'une aiguille 23 G sur un gel de 1,5 mm d'épaisseur (gel de séparation 7.5 % acrylamide et gel de regroupement 4% acrylamide, annexe 1) pourvu d'un seul puits. L'électrophorèse s'est poursuivie à 50 V pendant 18 h à l'aide d'un générateur de courant de marque Buchler (Buchler instruments, Fort Lee, NJ, USA) dans un tampon d'électrophorèse en plaque (annexe 1) jusqu'à ce que le front de bleu de bromophénol arrive au bout du gel. Après l'électrophorèse, 1 cm des extrémités gauche et droite du gel ont été coupées et colorées au bleu de coomassi 0,4% (p/v) (Bio-Rad). Par la suite, ces languettes ont été alignées de chaque côté de la portion de gel non coloré permettant ainsi de repérer les protéines sur le gel et de couper les bandes de gel correspondant aux protéines voulues.

1.5.2 Electroélution et dialyse des protéines

L'électroélution des protéines s'est faite à l'aide de l'appareil "Gel Rod Unit" (modèle GT-5, Hoefer Scientific Instrument, San Francisco, CA., USA). L'appareil est monté avec des pipettes sérologiques de 5 mL en borosilicate tronquées et bouchées par de l'acrylamide 4%. Au bout de chacune des pipettes était fixé un sac à dialyse de porosité 12-14 kDa

(Spectra/Por 2, Spectra medical industrie, LA, USA). Les bandes de gel correspondant aux protéines à électroéluer ont été coupées en petits morceaux et ces derniers ont été déposés dans les pipettes préalablement remplies avec du tampon d'électrophorèse en plaque. La chambre inférieure de l'appareil était remplie d'un tampon d'électrophorèse en tube (annexe 1) et la chambre supérieure était remplie d'un tampon d'électrophorèse en plaque. L'électroélution s'est poursuivie pendant 20 h à 150 V à 4°C avec agitation à l'aide d'un générateur de courant Buchler. Après l'électroélution, le contenu de la chambre inférieure a été remplacé par un tampon Tris 0,05 M pH 7,4 et les protéines ont été dialysées pour 2 périodes de 2 h contre ce tampon. Cette étape a été répétée deux autres fois avec un tampon Tris 0,008 M à pH 7,4. Le contenu des sacs à dialyse a finalement été rassemblé dans des tubes de polyallomère 5 mL (Beckman) et lyophilisé dans un appareil "Speed Vac" (Savant, Farmingdale, NY, USA) pendant 16-20 h.

1.5.3 Extraction du SDS résiduel des échantillons

Le SDS contenu dans les échantillons a été extrait à l'aide d'un solvant composé d'acétone (BDH, St-Laurent, Québec, Canada), de triéthylamine (Eastman, Rochester, NY, USA), d'acide acétique (BDH) et d'eau distillée dans des proportions de 85:5:5:5 tel que décrit par

Henderson et al., (1979). Les protéines resuspendues dans un volume de 3 mL de ce solvant ont été maintenues sur la glace pendant 1 h et agitées vigoureusement à toutes les 15 min. La récupération des échantillons s'est faite par une centrifugation à 30000 x g pendant 20 min à 4°C. Le culot de protéines a été resuspendu dans du PBS à pH 7.4 et la concentration protéique a été déterminée.

1.5.4 Chromatographie d'affinité sur colonne de NAPOA

Une chromatographie d'affinité sur colonne de NAPOA a également été utilisée afin de purifier la HA et la NA. Le virus purifié (1,5 mg) a d'abord été dissocié par un traitement au Nonidet P-40 (NP-40, Sigma) 1% (v/v) dans du tampon PBS à pH 7,4 pendant 1 h à 25°C pour être ensuite centrifugée 2 h à 145000 x g à 4°C. Le surnageant obtenu a été ajusté à 1mg/mL dans du PBS contenant 1% NP-40. Cette suspension a été déposée sur un gradient de saccharose 5-25% préparé dans du PBS contenant 1% de NP-40 pour être ensuite centrifugée pendant 18 h à 286000 x g à 4°C. Les fractions contenant la HA et la NA ont été récoltées et dialysées 2 h dans des sacs de porosité 12-14 kDa dans un tampon d'absorption (0,05 M acétate de sodium, 2 mM CaCl₂, 0,2 mM disodium éthylènediaminetétraacétate dihydrate (EDTA) et 0,1% NP-40) à pH 6,8. Les échantillons dialysés ont ensuite été déposés sur une colonne de 3 mL

remplie d'adsorbant NAPOA. La colonne a été lavée avec le tampon d'absorption et des fractions de 1 mL ont été récoltées (collecteur de fractions Ultrarac, LKB, Stockholm, Suède) à un débit de 1 mL/min. L'absorbance de chacune des fractions récoltées contenant la HA a été lue à une longueur d'onde de 254 nm. L'élution de la NA a été faite à l'aide de 0,1 M de sodium bicarbonate pH 9,1. Les échantillons de protéines ont ensuite été traités avec des Bio Beads SM-2 (30% du volume à traité) pendant 18 h à température de la pièce afin d'éliminer le NP-40, ils ont été resuspendus dans du tampon PBS à pH 7,4 et la concentration protéique a été déterminée.

1.6 Préparation des anticorps polyclonaux anti-NA/HA.

1.6.1 Purification des anticorps

Les anticorps polyclonaux anti-NA et anti-HA ont été produits chez des lapins blancs de Nouvelle Zélande tel que décrit par Arora et al., (1984). La purification des anticorps s'est fait par une chromatographie d'affinité. Un volume de 5 mL de sérum a été filtré sur laine de verre et récolté dans des tubes de polyallomère de 5 mL (Beckman). Les tubes ont été centrifugés à 20000 x g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant ainsi récolté a été dilué 10 fois avec du tampon PBS à pH 8 et déposé sur une colonne de 3 mL remplie de protéine A sepharose (Pharmacia Biotech,

Uppsala, Suède). La colonne a été lavée avec plusieurs volumes de PBS pH 8 et des fractions de 1 mL ont été récoltées à un débit de 1 mL/min. L'absorbance de chacune des fractions récoltées a été lue à une longueur d'onde de 280 nm et l'élution a débuté lorsque l'absorbance était stable et prêt de zéro. Les anticorps ont été élués avec de l'acide citrique 0,1 M à pH 3 et récupérés dans des tubes contenant 0,05 mL de Tris 2 M à pH 8. Les fractions contenant les IgG ont été rassemblées et dialysées dans des sacs de porosité 12-14 kDa pour deux périodes de 2 h contre 1 L de tampon PBS à pH 7,4. La concentration protéique a été déterminée et les anticorps ont été aliquotés à raison de 1 mg par tubes puis conservés à -80°C.

1.6.2 Fragmentation des anticorps par digestion à la pepsine

La fragmentation des anticorps s'est faite tel que décrit par Arora et al., (1984). Une quantité de 1 mg d'IgG a été dialysée dans des sacs de porosité 12-14 kDa contre 1 L de tampon acétate 0,1 M à pH 4.3. Après la dialyse, les IgG ont été mises en présence de la pepsine (Sigma) dans un ratio immunoglobulines/pepsine de 50:1. Ce mélange a été incubé à 37°C pendant 16 h dans un bain marie et la réaction a été arrêtée en déposant les tubes sur la glace. Les immunoglobulines fragmentées ont été dialysées dans des sacs de porosité 12-14 kDa pour deux périodes de 2 h contre du tampon PBS à pH 8. L'isolement des fragments F(ab')₂ a été effectué par

une chromatographie d'affinité sur colonne de protéine A sepharose. La colonne a été lavée avec plusieurs volumes de PBS à pH 8. L'absorbance de chacune des fractions a été lue à 280 nm et les fractions contenant les fragments ont été rassemblées et conservées à -80°C. La concentration protéique a été déterminée et l'analyse des fragments a été faite à l'aide d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS.

1.7 Gels analytiques

Les gels analytiques du virus et des diverses protéines étaient faits à partir d'électrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de SDS selon la méthode décrite par Laemmli (1970) à l'aide de l'appareil "Mini-protein II Electrophoresis System" (Bio-Rad). Des quantités de 10 µg de virus ou 2 µg de protéines ont été resuspendues dans un tampon d'échantillon et incubée à 100°C pendant 5 min. L'échantillon a été déposé sur un gel de 0,75 mm d'épaisseur (gel de séparation 10% et gel de regroupement 4%) pourvu d'un peigne à 10 puits. L'électrophorèse s'est effectuée sous une tension constante de 200 V générée par un appareil Bio-Rad (modèle 250/2.5) pendant 45 min dans un tampon d'électrophorèse en plaque. Le poids des protéines a été évalué à l'aide d'un mélange de protéines standard (2 µg), provenant de la compagnie Amersham (Oakville, Ontario, Canada), traitées de la même façon que les échantillons. Le

mélange comprend la myosine (200 kDa), la phosphorylase b (97,4 kDa), le BSA (66,2 kDa), l'olvalbumine (45 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31 kDa), l'inhibiteur de la trypsine de la fève de soya (21,5 kDa) et le lysozyme (14,4 kDa).

1.8 Coloration des gels analytiques

Une coloration au nitrate d'argent a été utilisée pour visualiser les protéines sur les gels analytiques (Andrews 1981). Le gel a d'abord été fixé sous agitation constante pendant 60 min dans une solution de méthanol, d'acide acétique glaciale et d'eau distillée dans les proportions 5:5:1. Cette solution a ensuite été remplacée par un volume de 100 mL d'une solution de glutaraldéhyde 10 % (Fisher) et après 20 min sous agitation constante, le gel a été lavé avec 200 mL d'eau distillée pendant 4 périodes de 15 min chacune. Le gel a par la suite été mis en présence d'un volume de 100 mL d'une solution de nitrate d'argent ammoniacal (0,78 % p/v, annexe 1) pendant 15 min et a ensuite été lavé avec de l'eau distillée pendant 2 min. L'eau a été remplacée par 100 mL de solution développante (annexe 1) et la coloration des bandes de protéines a été arrêtée avec de l'acide acétique glaciale 1 % lorsque les protéines devenaient bien visibles.

2.0 Préparation des PMNL

2.1 Isolement des PMNL

Les PMNL ont été prélevés du sang de volontaires travaillant à l'Institut Armand-Frappier. Les cellules ont été isolées à l'aide du milieu "Lympholyte-poly" (Cederlane, Hornby, Ontario, Canada) selon les recommandations du manufacturier. Un volume de 5 mL du sang périphérique frais a été délicatement déposé sur 3 mL de milieu contenu dans des tubes de polystyrène (Falcon, Fisher). Les tubes ont été centrifugés à 300 x g pendant 35 min à 20°C. Après la centrifugation les globules rouges se retrouvaient au culot tandis que les PMNL se situaient entre les globules rouges et l'interphase. Les cellules ont été récoltées et le volume complété à 30 mL avec du tampon HBSS (Gibco BRL, Burlington, Ontario, Canada) sans calcium et magnésium et une centrifugation de 10 min à 200 x g à 4°C a suivie. Le culot de cellules lavées du milieu de séparation a été soumis à un choc osmotique avec 2 mL d'eau distillée froide sous agitation au vortex pendant 10 sec. Par la suite, un volume de 8 mL de tampon HBSS a été ajouté et les cellules ont été centrifugées de nouveau comme mentionné plus haut pour un deuxième lavage. Le culot de cellules a été resuspendu dans 1 mL de HBSS et le nombre de cellules viables a été compté par exclusion au bleu de Trypan (Fisher; solution 0,5% p/v dans du PBS). La concentration cellulaire a été ajustée à 1×10^6 cellules/mL avec du HBSS et un volume de 0,5 mL de la suspension de

PMNL a ensuite été déposé dans un tube eppendorf de 1,5 mL (Fisher). Les cellules ont été conservées à 4°C jusqu'à la stimulation.

2.2 Stimulation des PMNL

Les PMNL en suspension ont reçu des doses variant de 0 µg à 7,5 µg de virus entier purifié et des doses variables (0 à 2 µg) de protéines virales. Les cellules ont été incubées à 37°C pour des périodes de temps différentes (0 à 60 min). Après la stimulation, la réaction a été arrêtée avec 4 volumes de HBSS froid et les cellules ont été centrifugées pendant 10 min à 200 x g à 4°C. Le culot de cellules a été resuspendu dans 0,05 mL de tampon d'essai froid (annexe 1) et maintenu sur glace jusqu'au dosage de l'activité PKC. Les antigènes utilisés pour la stimulation étaient le virus influenza purifié A/USSR, et les protéines HA, NA et M de la même souche virale.

2.3 Inhibition de l'activité PKC induite par le virus et les glycoprotéines par l'utilisation d'anticorps

Les PMNL ont été mis en présence de complexes antigène/anticorps préalablement formés. Des quantités de 0,25 µg de protéines virales et 5 µg de virus entier ont été mis en présence d'un excès de fragments F(ab')₂ anti-NA/HA. La réaction antigène/anticorps s'est poursuivie pendant 1 h à

37°C tel que décrit par Arora et al., (1984). Les cellules ont ensuite été mises en présence de ces complexes 30 min à 37°C. Les PMNL ont par la suite été préparés pour le dosage de l'activité PKC tel que décrit à la section 2.2.

2.4 Études de compétition

Les PMNL ont été mis en présence de 0,25 µg de HA ou de NA pour une période de 5 min à 37°C. Après cette première incubation, un échantillon de cellules a été prélevé et préparé pour la mesure de l'activité PKC tel que décrit à la section 2.2. Par la suite une quantité de 0,25 µg de HA ou de NA ou 1 µM de PMA ont été ajoutés aux cellules restantes pour une incubation additionnelle de 30 min à 37°C. Par la suite, ces cellules ont également été préparées pour la mesure de l'activité PKC tel que décrit à la section 2.2.

2.5 Isolement des fractions particulières et cytosoliques

Les fractions membranaire et cytosolique ont été isolées selon la méthode de Charkravarthy et al., (1992). Les cellules stimulées ont été resuspendues dans un milieu de lyse hypotonique froid (annexe 1) à une concentration de 1×10^6 cellules/mL et ont été conservées sur glace pour subir deux sonications de 15 sec chacune à 20 megahertz/sec. La

suspension a par la suite été centrifugée pendant 5 min à 600 x g à 4°C. Le surnageant contenant les membranes et le cytosol a été récupéré et centrifugé pendant 30 min à 16000 x g à 4°C. Les membranes ont été récoltées au culot et resuspendues dans le tampon d'essai tandis que le surnageant constituait la fraction cytosolique. La concentration en protéines de chacune des fractions (membranaire et cytosolique) a été déterminé et 4 µg de protéines ont été utilisées pour la mesure de l'activité PKC.

3.0 Mesure de l'activité PKC

3.1 Activité PKC associée à la membrane cellulaire.

L'activité PKC associée à la membrane cellulaire a été mesurée selon la méthode de Chakravarthy et al., (1991). Le milieu réactionnel (0,05 mL final) contenait 2×10^5 cellules resuspendues dans le tampon d'essai ou 4 μ g de membranes isolées, 75 μ M de substrat composé de la séquence d'acides aminés 4 à 14 de la protéine basique de la myéline, ("acetylated peptide containing myelin basic protein", Ac-MBP (4-14)), Boehringer Mannheim, Laval, Québec, Canada), 1 μ M de chlorure de calcium (Fisher), et 50 μ M d'ATP radioactif [γ 32 P] (Amersham, activité spécifique 110 cpm/pmol). Après l'incubation de 10 min à 25°C dans un bain marie, la réaction a été arrêtée par l'ajout d'acide acétique glacial 5%. Les échantillons ont été centrifugés 15 sec 10000 x g à 4°C et 0,045 mL de ces échantillons ont été déposés sur des papiers filtres (Whatman P81, Fisher) de 2 cm². Les filtres ont été lavés pour deux périodes de 10 min dans de l'acide acétique glacial 5% avec faible agitation, séchés à l'air libre pendant quelques minutes et déposés dans des vials à scintillation contenant un volume de 7 mL de liquide à scintillation "Formula 989" (New England Nuclear, Mississauga, Ontario, Canada). La mesure de la radioactivité contenue sur chaque papier a été faite à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (Tri-Carb modèle 2200 CA, Packard instruments, Ill, USA). L'activité mesurée après 0 min de la réaction enzymatique a été soustraite de

l'activité obtenue après 10 min de la réaction enzymatique résultant ainsi en l'activité PKC nette.

3.2 Activité PKC de la fraction cytosolique

La mesure de l'activité PKC de la fraction cytosolique a été faite selon la méthode de Chakravarthy *et al.*, (1992). Le milieu réactionnel contenait 4 µg de protéines provenant de la fraction cytosolique, 75 µM de substrat Ac-MBP (4-14), 1 µM de chlorure de calcium, 50 µM d'ATP radioactif [γ 32 P] (activité spécifique 110 cpm/pmol), 1 µM de PMA (Sigma) dissous dans du diméthylsulfoxyde à une concentration de 0,002 M et 10 µg de PS (Sigma) La PS a été dissous dans une solution de méthanol:chloroforme 5:95, évaporée avec de l'azote gazeux et conservée à -20°C. Avant l'utilisation le produit a été resuspendu dans du tampon d'essai et a subi une sonication de 10 sec à 30 megahertz/sec. La réaction enzymatique ainsi que la préparation des échantillons pour la mesure de la radioactivité ont été effectuées selon la méthode décrite à la section 3.1.

4.0 Statistiques

Les expériences ont été répétées trois à cinq fois avec des échantillons faits en duplicata. Les résultats présentés dans les tableaux ou les figures représentent une moyenne du nombre d'expériences indépendantes effectuées en duplicata. Afin de vérifier si la différence entre les échantillons testés et les témoins de cellules non stimulées est significative, un test de *t* Student a été effectué. Les résultats étaient considérés significatif lorsque la valeur de *p* était inférieure à 0,05.

RÉSULTATS

1.0 Profil peptidique du virus et des protéines virales purifiés

1.1 Virus

La figure 8 présente le profil polypeptidique du virus influenza A/USSR/90/77 purifié par centrifugation isopycnique sur gradient de saccharose selon la méthode de Arora et al.,(1985). Le puits 2 contient le virus sous conditions non réductrices. Les bandes observées correspondent aux protéines telles qu'identifiées par Phelan et al., (1980), soit les formes dimérique (180 kDa) et monomérique (85 kDa) de la HA, la forme oligomérique de la NA (140 kDa), la NP (56 kDa) et la protéine M (29 kDa). Les standards de poids moléculaire sont décrits à la section 1.7 de la partie matériels et méthodes.

1.2 Protéines virales

Le profil des protéines virales purifiées est présenté à la figure 9. Les bandes correspondent aux protéines du virus influenza telles qu'identifiées selon Phelan et al., (1980). Le puits 2 contient la NA oligomère en conditions non réductrices où une seule bande y est visible à 140 kDa. Le puits 3 contient la HA monomère non réduite à 80 kDa et le puits 4 correspond à la protéine M qui a une masse de 29 kDa. Les standards de poids moléculaire sont décrits à la section 1.7 de la partie matériels et méthodes.

Figure 8. Profil peptidique du virus grippal.

Image digitalisée d'un gel de polyacrylamide 10% présentant le profil polypeptidique du virus influenza A/USSR/90/77. La souche virale a été purifiée par ultracentrifugation isopycnique sur gradient de saccharose. Une quantité de 10 µg de virus et 2 µg de protéines standards ont été dissociés par ébullition dans le tampon d'échantillon sous conditions non réductrices. L'électrophorèse s'est poursuivie pendant 45 min sous une tension constante de 200 V. Le gel a ensuite été coloré au bleu de coomassie. Les protéines standards sont au puits 1 et le puits 2 comprend le virus où sont identifiées les protéines virales.

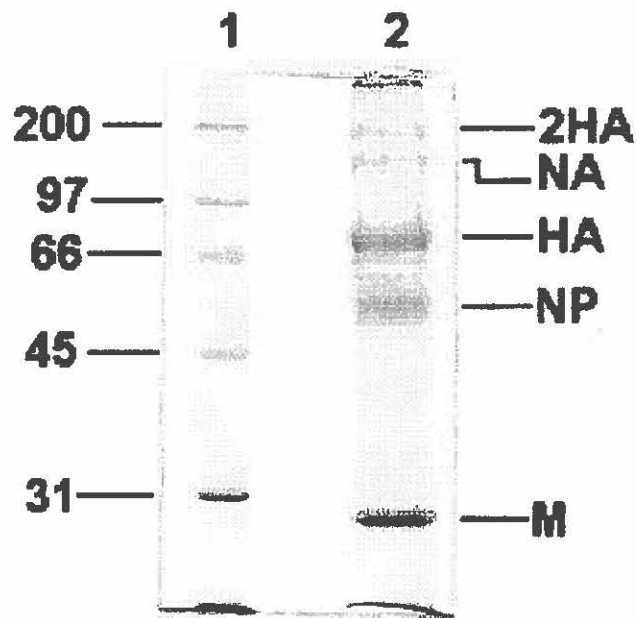


Figure 9. Vérification de la pureté des protéines virales.

Image digitalisée d'un gel de polyacrylamide 10% démontrant les protéines virales purifiées. Les protéines ont été purifiées par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Des quantités de 2 µg de chacune des protéines et 2 µg de protéines standards ont été dissociées dans le tampon d'échantillon sous conditions non réductrices et l'électrophorèse s'est poursuivie pendant 45 min sous une tension constante de 200 V. Les protéines ont ensuite été visualisées par une coloration au nitrate d'argent. Le puits 1 contient les protéines standards et les puits 2, 3 et 4 contiennent respectivement les protéines NA, HA et M.

2.0 Activité PKC des PMNL

2.1 Réponse des PMNL face au virus entier

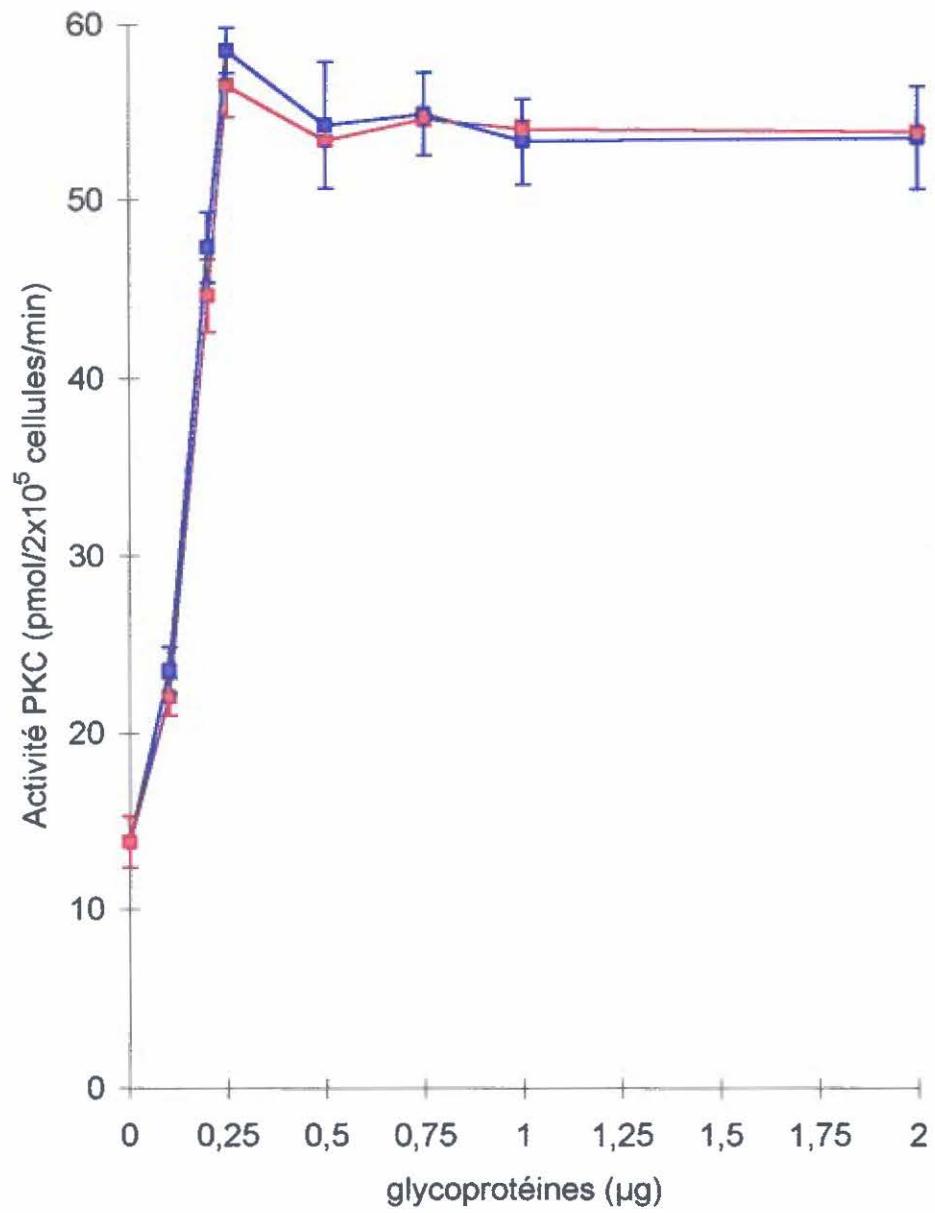
Selon Hartshorn et al., (1992b), le virus influenza active les neutrophiles en utilisant les mêmes mécanismes de transduction utilisés par le FMLP, soit en activant la PKC. Nous avons donc vérifié le potentiel du virus à stimuler l'activité PKC selon nos conditions expérimentales. Les PMNL ont été mis en présence de doses de virus variant de 0 à 7.5 µg pendant 30 min à 37°C. L'activité de l'enzyme a ensuite été mesurée par la quantification de phosphates radioactifs incorporés dans un substrat synthétique, tel que décrit à la section 3.1 de la partie matériels et méthodes. Les cellules non traitées montraient une activité PKC de base à $15,4 \pm 1,7$ pmol/ 2×10^5 cellules/min. Un traitement des cellules avec 2,5 µg de virus a provoqué une élévation d'activité à $26,8 \pm 2,2$ pmol/ 2×10^5 cellules/min et l'addition de 5 µg de virus a résulté en une augmentation de l'activité PKC ($51,9 \pm 3,7$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) près de quatre fois supérieure par rapport aux cellules non traitées. Au delà de 5 µg de virus, un plateau était atteint puisque les PMNL traitées avec 7,5 µg de virus montraient une activité PKC de $49,0 \pm 2,8$ pmol/ 2×10^5 cellules/min. Ces résultats confirment le potentiel qu'a le virus influenza d'activer la PKC des PMNL.

2.2 Courbe dose-réponse avec les glycoprotéines purifiées

Afin de déterminer quelles sont les protéines qui confèrent au virus le potentiel d'activer la PKC, nous avons vérifié l'effet des glycoprotéines HA et NA purifiées sur l'activité PKC des PMNL en incubant les cellules en présence de doses de HA et de NA biologiquement inactives, variant de 0 à 2 µg, pendant 30 min à 37°C (figure 10). L'activité de la PKC a ensuite été mesurée par la méthode décrite à la section 3.1 de la partie matériels et méthodes. Les PMNL traités au PBS montraient une activité de base à $13,8 \pm 1,5$ pmol/ 2×10^5 cellules/min. L'augmentation de la quantité de HA jusqu'à 0,25 µg a résulté en une augmentation linéaire ($r = 0,98$) de l'activité PKC. L'addition de 0,1 µg de HA aux cellules a augmenté près de deux fois l'activité de l'enzyme, suivie par une autre augmentation de la même magnitude lorsque la dose de HA a été élevée à 0,2 µg. L'activité maximum ($59,0 \pm 1,3$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) a été observée à 0,25 µg de HA et est significativement supérieure ($p < 0.05$) à l'activité des PMNL traités au PBS. La stimulation paraissait optimale à cette dose puisqu'une augmentation de la quantité de HA à 2 µg n'a pas provoqué une augmentation d'activité PKC ($53,4 \pm 2,9$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) significativement différente de celle observée à 0,25 µg. Une courbe dose-réponse similaire a été observée pour la NA. L'activité optimale ($56,5 \pm 1,8$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) a également été observée à 0,25 µg de NA et un plateau a été atteint au delà de cette dose.

Figure 10. Activité de la PKC des PMNL humains en fonction de la concentration de glycoprotéines.

Les PMNL suspendus dans du tampon HBSS ont été stimulés par différentes concentrations de HA —■— ou NA —■— (0 à 2 µg) pour une période de 30 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été testées pour leur activité PKC. Les valeurs représentent l'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) et sont la moyenne de trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

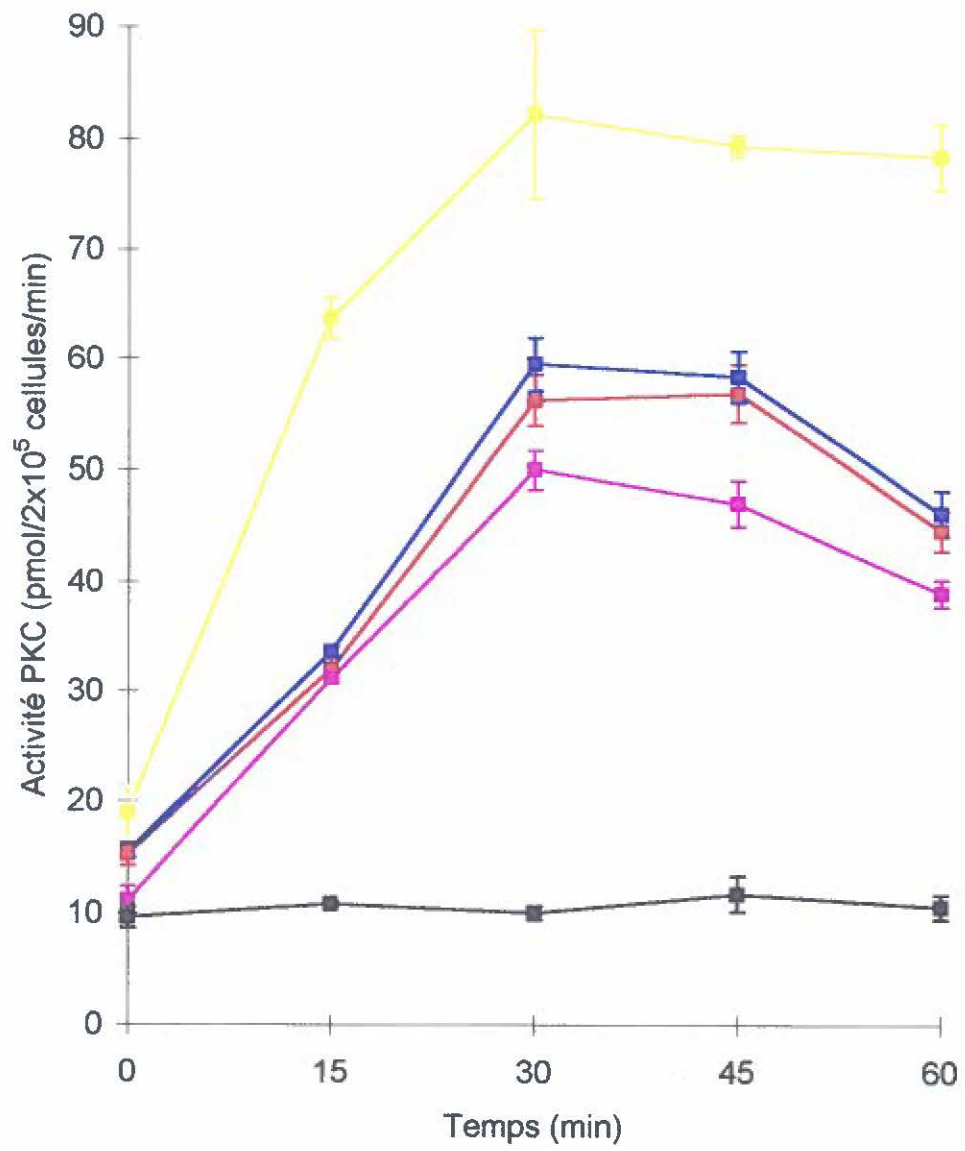


2.3 Cinétique du temps

Les PMNL ont été mis en présence de 5 μg de virus, 0,25 μg de chacune des glycoprotéines purifiées, HA et NA dépourvues d'activité biologique et 1 μM de PMA pour une période de 0 à 60 min à 37°C afin de déterminer l'effet de ces composantes virales, sur l'activité PKC en fonction du temps de stimulation. À toutes les 15 minutes, des échantillons cellulaires étaient prélevés et préparés pour la mesure de l'activité PKC. Les PMNL traités au PBS ne montraient aucune augmentation d'activité PKC en fonction du temps alors que les cellules traitées avec les glycoprotéines ou le virus montraient une augmentation d'activité deux fois supérieure par rapport au temps 0 dès les premières 15 minutes. Après 30 min de stimulation, l'activité PKC des cellules traitées par le virus ou par HA et NA était près de quatre fois plus élevée qu'au temps 0. La stimulation des cellules pendant 30 min paraissait optimale puisque dans les trois cas, (cellules traitées par le virus, HA et NA) l'activité PKC était stable de 30 à 45 min. Une stimulation prolongée de 45 à 60 min a provoqué une perte d'activité PKC (figure 11). Le PMA qui est reconnu comme un activateur potentiel de la PKC a été utilisé à titre de témoin positif. Les PMNL traités au PMA montraient une augmentation significative de l'activité PKC après 15 min de stimulation, soit plus de trois fois supérieure par rapport au temps 0. Cette augmentation d'activité s'est poursuivie jusqu'à 30 min et est demeurée stable jusqu'à 60 min.

Figure 11. Activité de la PKC des PMNL humains en fonction du temps.

Les PMNL suspendus dans du tampon HBSS ont été stimulés avec 5 μg de virus —■— et avec la dose optimale (0,25 μg) de HA —■— et NA —■— pour des périodes de temps de 0 à 60 min. À toutes les 15 min, des échantillons cellulaires étaient prélevés et les cellules ont été testées pour leur activité PKC. Les PMNL traités au PMA (1 μM) —■— et au PBS —■— ont servi respectivement de témoin positif et négatif. Les résultats représentent l'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) et sont la moyenne de trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.



2.4 Comparaison du potentiel des divers stimulateurs pour activer la PKC

Le potentiel du virus entier et de ses protéines purifiées à stimuler l'activité PKC a été comparé au cours d'une même expérience à partir d'un même donneur de sang. Les données décrites au tableau III ont confirmé les résultats obtenus aux sections 2.1 à 2.3 puisque les cellules traitées par 5 µg de virus pendant 30 min à 37°C montraient une augmentation d'activité PKC ($67,4 \pm 3,8$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) plus de trois fois supérieure par rapport aux cellules non traitées ($20,3 \pm 0,9$ pmol/ 2×10^5 cellules/min). Des doses de 0,25 µg de HA (sans activité hémagglutinante) ou de NA (sans activité enzymatique), ont également augmenté l'activité PKC environ quatre fois par rapport au témoin PBS. De plus, les glycoprotéines partagent leur potentiel à stimuler l'activité de l'enzyme avec la protéine M. Cette dernière, qui a été utilisée à la même dose (0,25 µg) que les glycoprotéines pour fins de comparaison, montrait un potentiel identique aux protéines HA et NA. La protéine BSA (0,25 µg) a également été ajoutée au test afin de vérifier la spécificité des protéines virales à stimuler la PKC des PMNL. Purifiée à partir d'un gel de polyacrylamide dans les mêmes conditions que les protéines virales, cette protéine n'a pas provoqué d'augmentation significative de l'activité PKC lorsque comparée au témoin PBS. Finalement, le PMA (1 µM), utilisé à titre de témoin positif, a provoqué une élévation de l'activité de la kinase, qui s'est

Tableau III. Comparaison du potentiel des divers stimulateurs pour activer la PKC.

Stimulateurs ^a	Activité PKC
	(pmol/2x10 ⁵ cellules/min) ^b
PBS	20,3 ± 0,9
BSA	23,0 ± 1,2
PMA	98,9 ± 3,7 ^c
virus	67,4 ± 3,8 ^c
HA	80,0 ± 7,6 ^c
NA	83,6 ± 8,0 ^c
M	86,2 ± 9,0 ^c

^a Les cellules ont été mises en présence de 1 µM de PMA, 5 µg de virus, et 0,25 µg de BSA, HA, NA et M pendant 30 min à 37°C.

^b Les valeurs représentent l'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) et sont la moyenne de cinq expériences indépendantes faites en duplicata.

^c L'augmentation d'activité est significative par rapport aux PMNL non stimulés (PBS).

trouvée cinq fois plus élevée en comparaison à l'activité des cellules non traitées.

2.5 Effet des glycoprotéines biologiquement actives sur l'activité PKC

Il a été démontré dans les paragraphes précédents, que la HA dépourvue de son activité hémagglutinante et la NA enzymatiquement inactive avaient le potentiel d'activer la PKC des PMNL. Nous avons également vérifié si l'activation de la PKC par les glycoprotéines était dépendante de l'activité hémagglutinante de la HA et de l'activité enzymatique de la NA. Le tableau IV fait une comparaison entre le potentiel des glycoprotéines dotées de leur activité biologique et le potentiel des glycoprotéines dépourvues de leur activité hémagglutinante et neuraminidase. Les protéines HA⁺ et NA⁺, qui sont pourvues de leur activité biologique, ont montré la capacité d'activer la PKC des PMNL de façon significative. L'activité ($67,1 \pm 2,5$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) détectée chez les cellules mises en présence de la HA⁺, était environ trois fois plus élevée par rapport aux cellules non traitées ($19,9 \pm 0,8$ pmol/ 2×10^5 cellules/min). Cette augmentation significative de l'activité de la PKC a également été détectée chez les cellules traitées avec la NA⁺ ($67,7 \pm 1,7$ pmol/ 2×10^5 cellules/min). De plus, ces résultats démontrent que les glycoprotéines biologiquement actives, avaient un potentiel d'activation de

Tableau IV. Effet des glycoprotéines biologiquement actives sur l'activité PKC.

Stimulateurs ^a	Activité PKC
	(pmol/2x10 ⁵ cellules/min) ^b
PBS	19,9 ± 0,8
PMA	82,4 ± 0,8 ^e
HA	70,7 ± 2,9 ^e
HA+ ^c	67,1 ± 2,5 ^e
NA	69,8 ± 1,3 ^e
NA+ ^d	67,7 ± 1,7 ^e

^a Les cellules ont été mises en présence de 1µM de PMA, et 0,25 µg de HA, HA+, NA et NA+ pour une période de 30 min à 37°C.

^b Les valeurs représentent l'activité PKC totale sur le substrat AcMBP (4-14) et sont la moyenne de trois expériences indépendantes faites en duplicata.

^c Hémagglutinine pourvue de son activité hémagglutinante.

^d Neuraminidase pourvue de son activité enzymatique.

^e L'augmentation d'activité est significative par rapport aux PMNL non stimulés (PBS).

la PKC similaire à celui des protéines dépourvues de leur activité biologique, puisqu'il n'y a pas de différence significative dans la réponse des PMNL mis en présence des protéines actives ou inactives.

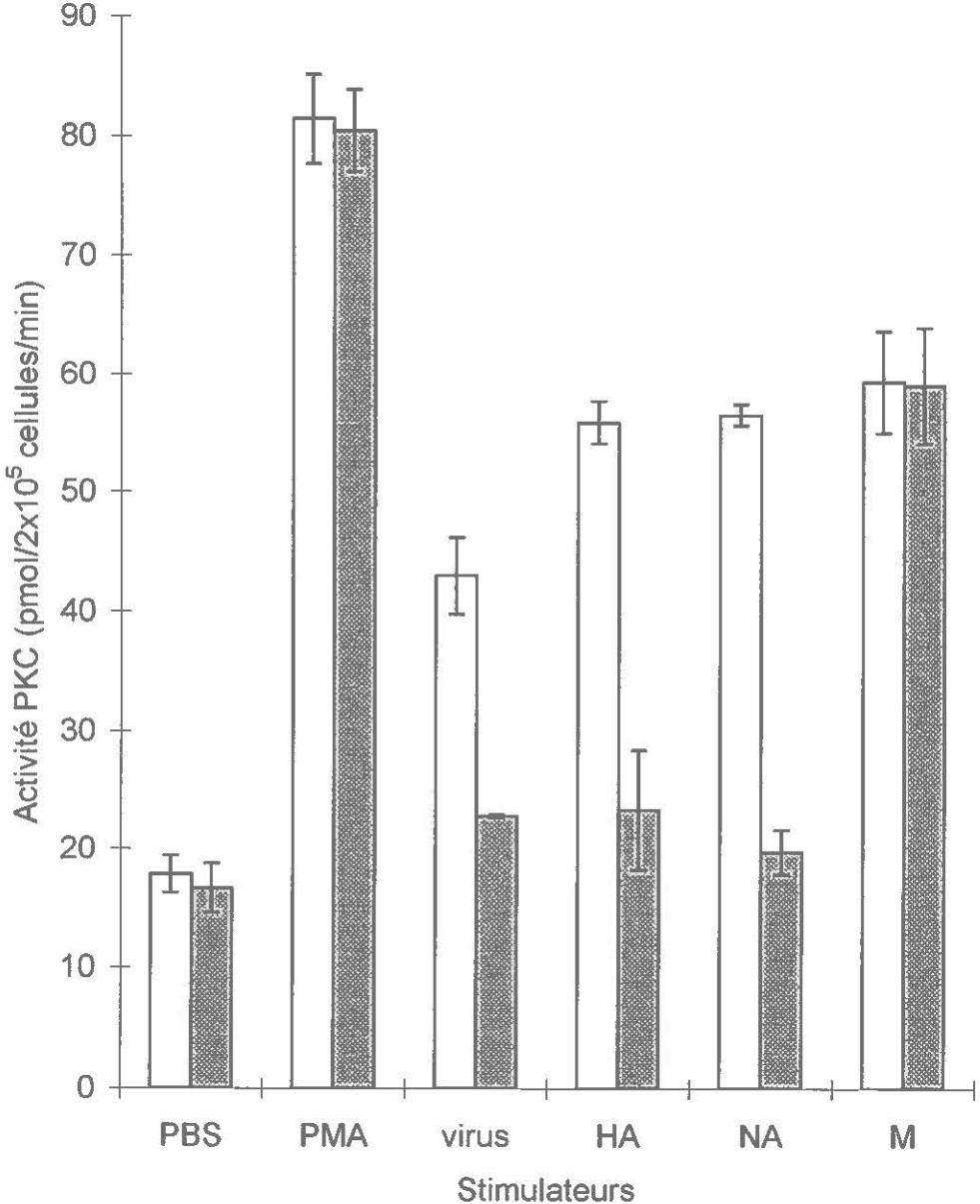
3.0 Spécificité des glycoprotéines

3.1 Inhibition par les fragments F(ab')₂

La spécificité des glycoprotéines à stimuler la PKC des PMNL a été confirmée à l'aide d'anticorps dirigés contre la NA et la HA. Puisque les PMNL possèdent des récepteurs pour la portion Fc des immunoglobulines, les anticorps ont donc été digérés à la pepsine, générant ainsi des fragments F(ab')₂, permettant d'éviter toute forme d'interférence. Les différents stimulateurs (PMA, virus, HA sans activité hémagglutinante, NA sans activité enzymatique et M) utilisés, ont été incubés pendant 1 h à la température de la pièce en présence d'un excès de fragments F(ab')₂ et ce mélange a ensuite été incubés à 37°C avec les PMNL. Les résultats présentés à la figure 12 indiquent que les fragments F(ab')₂ n'ont eu aucun effet sur l'activité PKC, puisque les cellules incubées avec 10 µg de fragments F(ab')₂, n'ont montré aucun changement d'activité par rapport au témoin PBS. Quant aux cellules incubées avec le complexe virus-F(ab')₂, une diminution d'activité de 47%, par rapport à l'activité des cellules incubées avec le virus seul, a été observée. Des diminutions de 58% et 65% ont été observées chez les PMNL incubés avec les complexes HA-F(ab')₂ et NA-F(ab')₂ respectivement, le niveau d'activité PKC de base (activité PKC des cellules non traitées) étant presque atteint. Contrairement, les anticorps n'ont eu aucun effet inhibiteur sur le potentiel

Figure 12. Inhibition de l'activité PKC des PMNL humains par les fragments $F(ab')_2$ anti-NA/HA.

Les stimulateurs (1 μ M de PMA, 5 μ g de virus et 0,25 μ g de HA, NA et M) ont été incubés avec 10 μ g de fragments $F(ab')_2$ anti-NA/HA pendant 1 h à la température de la pièce. Les cellules ont ensuite été mises en présence des complexes ainsi formés pour une période de 30 min à 37°C et l'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) a été mesurée. Les valeurs représentent une moyenne de trois expériences indépendantes faites en duplicata. ■ 10 μ g $F(ab')_2$; □ 0 μ g $F(ab')_2$



de la protéine M et du PMA confirmant la spécificité des anticorps vis à vis les glycoprotéines HA et NA.

4.0 Spécificité de la protéine kinase C

4.1 Inhibition de l'activité PKC par un inhibiteur spécifique

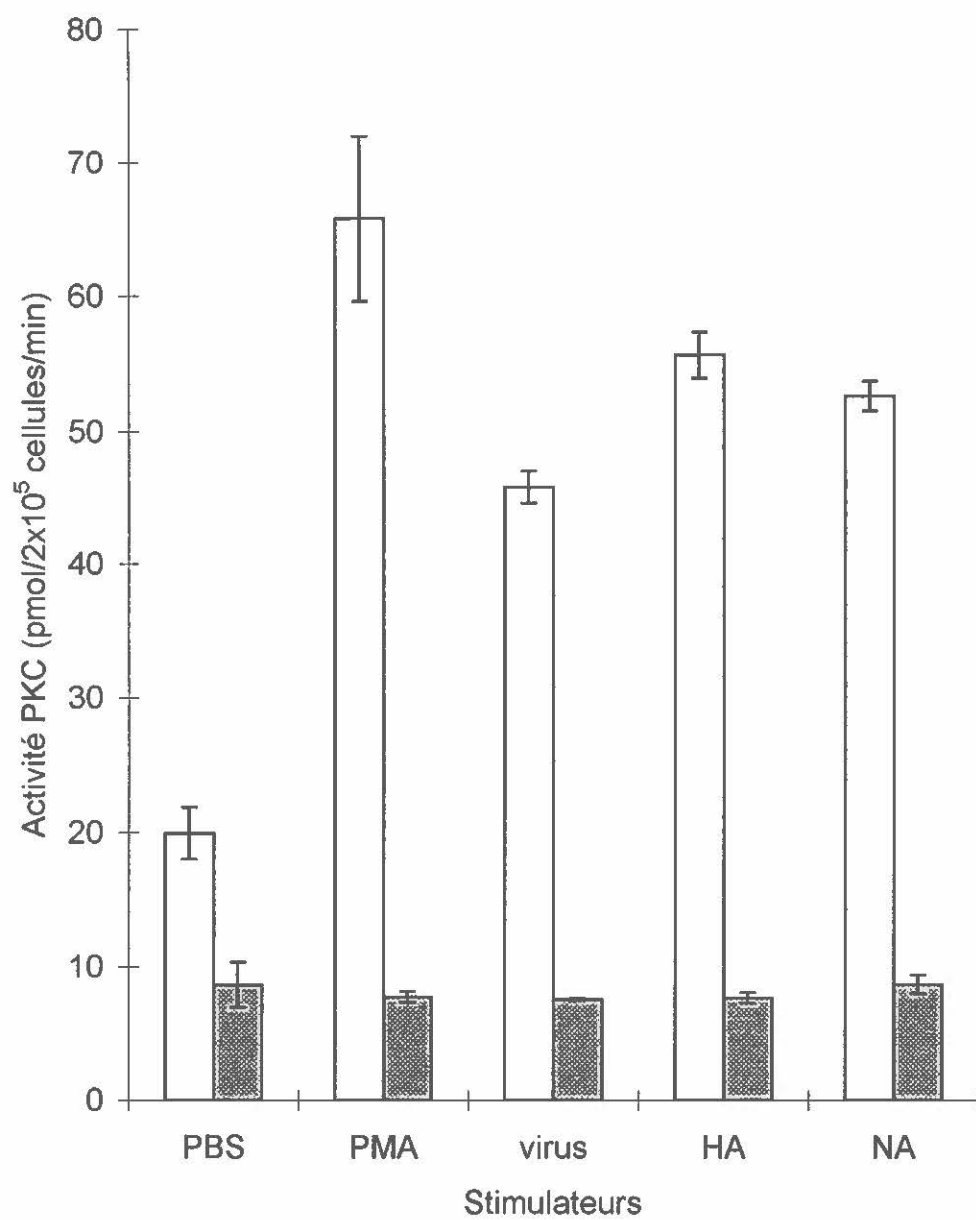
Un inhibiteur synthétique spécifique à la famille des cPKC a été utilisé afin de vérifier si celles-ci étaient responsables de l'activité détectée. Les cellules ont été stimulées par le PMA, le virus et les glycoprotéines biologiquement inactives pendant 30 min à 37°C. Au moment de mesurer l'activité de l'enzyme, un inhibiteur, le peptide (19-31) a été incorporé dans le milieu réactionnel. Une dose de 50 μ M de peptide (19-31) a fortement inhibé l'activité PKC des PMNL. Les résultats présentés à la figure 13 montrent une diminution d'activité PKC près de 90% dans tous les cas par rapport aux résultats obtenus en absence d'inhibiteur. L'activité chez les cellules non stimulées a également subi une baisse lorsque l'inhibiteur a été incorporé dans le milieu réactionnel reflétant ainsi un niveau d'activité de base chez ces cellules.

4.2 Dépendance de l'activité PKC au calcium

Parmi la douzaine de sous-espèces de PKC, quatre d'entre elles sont reconnues pour leur dépendance au calcium et elles font partie de la famille des cPKC (Nishizuka, 1988). L'activité de ces isoformes peut être supprimée en l'absence du calcium. Les cellules ont donc été traitées tel que décrit précédemment et au moment de mesurer l'activité de la kinase,

Figure 13. Inhibition de l'activité PKC des PMNL humains par un inhibiteur spécifique.

Les cellules ont été stimulées par 1 μM de PMA, 5 μg de virus et 0,25 μg de HA et NA pour 30 min à 37°C. L'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) a ensuite été mesurée avec et sans la présence de 50 μM d'inhibiteur dans le milieu réactionnel. Les valeurs représentent une moyenne de cinq expériences faites en duplicata. ■ 50 μM inhibiteur; □ 0 μM inhibiteur.



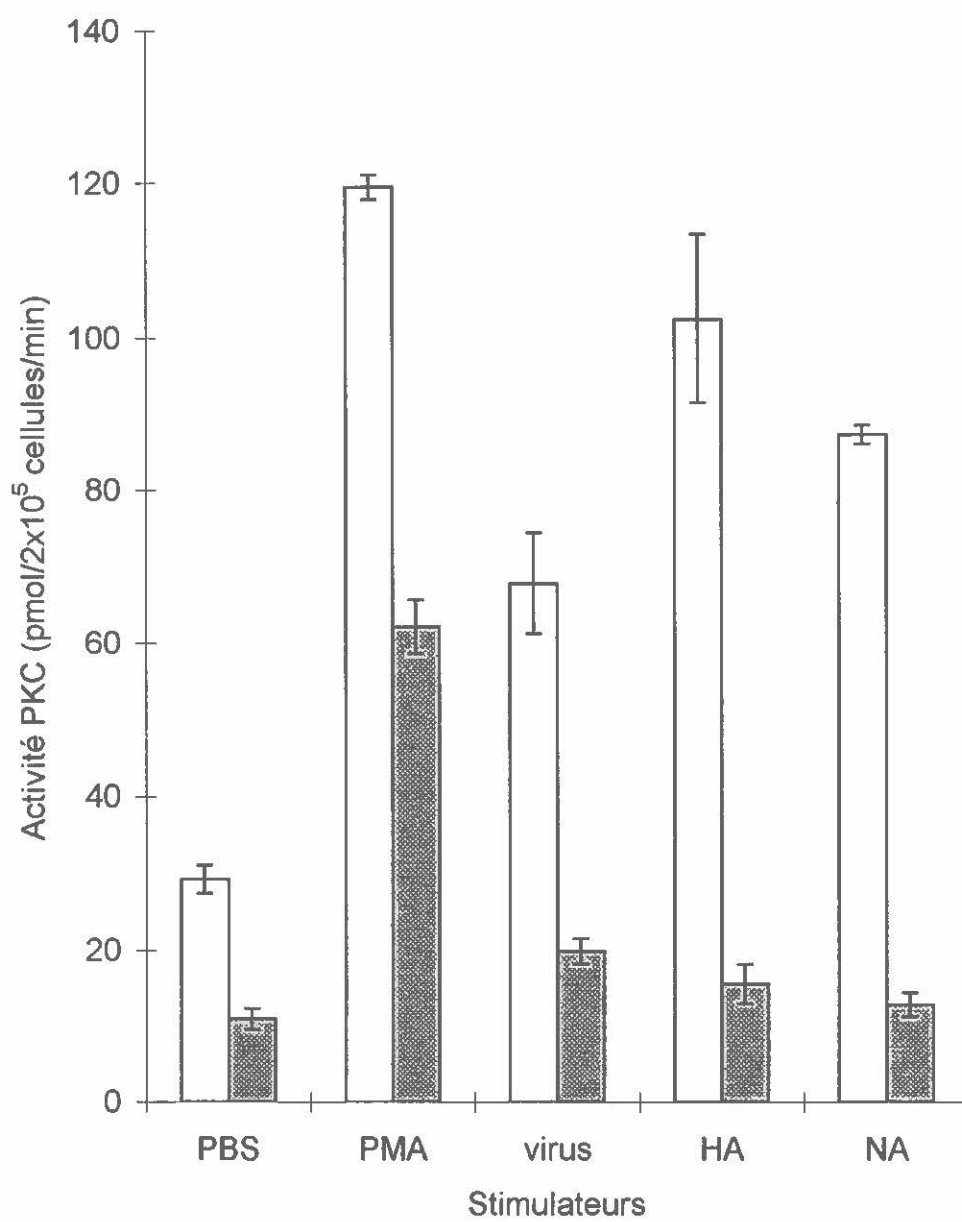
0,5 mM d'EDTA ont été ajoutés au milieu réactionnel, afin de vérifier la dépendance au calcium de l'enzyme détectée. Les résultats présentés à la figure 14 montrent qu'en l'absence de calcium dans le milieu réactionnel, l'activité de la PKC chez les cellules stimulées par le virus et les glycoprotéines (biologiquement inactives) a diminué de plus de 80% par rapport à l'activité mesurée en présence de calcium. Le témoin positif constitué des cellules traitées au PMA, a subi une diminution d'activité de 50%. Quant au témoin PBS une baisse a également été observée en l'absence de calcium, démontrant une activité de base chez les PMNL, due aux isoformes qui sont dépendantes du calcium.

4.3 Translocation de la PKC du cytosol à la membrane cellulaire

La PKC est située dans les fractions cytosolique et membranaire des cellules. En réponse à une stimulation cellulaire, une redistribution de l'enzyme, du cytosol à la membrane cellulaire, a lieu et cette translocation peut être un index de l'activation enzymatique. Les résultats décrits dans les sections précédentes indiquent que nous avons détecté l'activité PKC membranaire. Afin de vérifier si le virus et les protéines avaient provoqué la translocation nous avons donc mesurer l'activité de la PKC à partir des fractions cytosoliques et membranaires. Les cellules ont été mises en présence du PMA, du virus et des protéines HA et NA biologiquement

Figure 14. Dépendance au calcium de la PKC des PMNL humains.

Les cellules ont été traitées tel que mentionné précédemment. L'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) a ensuite été mesurée en présence de 1 μ M de calcium ou en présence de 0,5 mM de EDTA. Les valeurs représentent une moyenne de cinq expériences faites en duplicata. ■ 0,5 mM EDTA; □ 1 μ M calcium.



inactives pour des périodes de 0 et 30 min. Les fractions membranaires et cytosoliques ont ensuite été séparées. L'activité de l'enzyme a été mesurée à partir de quatre μg de chacune de ces fractions (tableau V). L'activité PKC cytosolique, chez les cellules stimulées par la HA et la NA, s'est trouvée cinq fois moins élevée suite à 30 min de stimulation. Quant à l'activité membranaire, elle s'est trouvée quatre fois plus élevée. La translocation s'est également produit chez les cellules stimulées par le virus purifié. L'activité membranaire a augmenté environ quatre fois après 30 min de stimulation par rapport au temps 0 min suite à une diminution de l'activité cytosolique du même ordre. Les cellules traitées au PMA ont montré une forte diminution de l'activité cytosolique, qui s'est trouvée près de 8 fois plus faible après une stimulation de 30 min. Toutefois, l'augmentation de l'activité membranaire n'a augmenté que deux fois après 30 min de stimulation par rapport au temps 0 min. Quant au témoin PBS, l'activité PKC est demeurée stable autant dans la fraction cytosolique que membranaire.

Tableau V. Translocation de la PKC.

Stimulateurs ^a	Activité PKC (pmol/ 4 µg de protéines/min) ^b			
	Fraction cytosolique ^c		Fraction membranaire ^c	
	0 min	30 min	0 min	30 min
PBS	26.4 ± 0.5	24.2 ± 0.2	9.9 ± 1.2	12.0 ± 2.4
PMA	38.0 ± 2.8	5.0 ± 1.8	23.1 ± 0.8	68.9 ± 0.7
virus	32.3 ± 1.8	8.4 ± 1.8	11.6 ± 2.2	45.4 ± 0.6
HA	35.9 ± 1.4	7.8 ± 0.2	16.2 ± 2.2	52.0 ± 1.9
NA	35.9 ± 0.5	8.0 ± 1.0	15.5 ± 2.6	51.9 ± 2.7

^a Les cellules ont été traitées par 1 µM de PMA, 5 µg de virus et 0,25 µg de glycoprotéines (HA et NA) pour des périodes de 0 et 30 min.

^b Les valeurs représentent l'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) et sont la moyenne de trois expériences indépendantes faites en duplicata.

^c Suite à la stimulation, les fractions membranaire et cytosolique ont été isolées tel que décrit à la section 2.5 de la partie Matériels et Méthodes et dosées pour leur contenu protéique. Une quantité de 4 µg de chacune de ces fractions a par la suite servie pour la mesure de l'activité PKC.

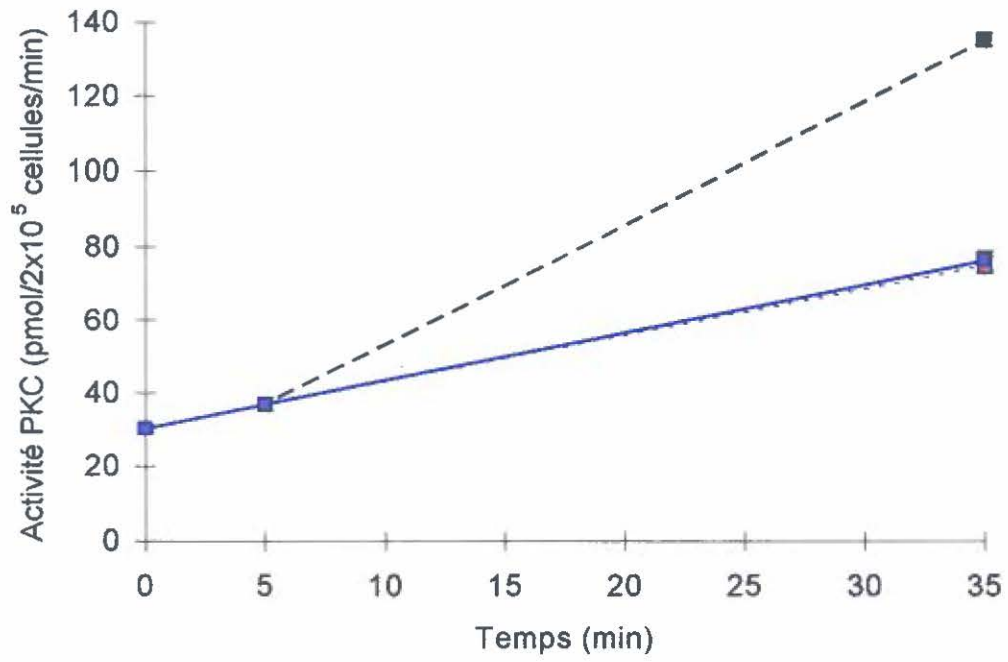
5.0 Compétition pour un site cellulaire

La possibilité de compétition entre les deux glycoprotéines (HA et NA) pour un site cellulaire pour activer la PKC des PMNL a été vérifiée. Les PMNL ont d'abord été traités avec 0,25 µg de HA (biologiquement inactive) pendant cinq min à 37°C et ils ont subi un second traitement avec 1 µM de PMA ou 0,25 µg de NA (biologiquement inactive) pour une période additionnelle de 30 min (figure 15a). L'inverse a également été fait, soit un premier traitement avec 0,25 µg de NA (biologiquement inactive) pour cinq min suivie d'un second traitement avec le PMA ou la HA (biologiquement inactive) pour 30 min (figure 15b). Les résultats démontrent que l'activité PKC ($134,5 \pm 1,8$ pmol/ 2×10^5 cellules/min), des cellules préalablement traitées par HA et stimulées subséquemment par le PMA, s'est trouvée près de deux fois supérieure par rapport à l'activité ($75,8 \pm 2,5$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) observée chez les cellules témoins traitées par HA seulement. Quant aux cellules traitées par HA et subséquemment stimulées par la NA, elles n'ont montré aucune différence significative ($74,7 \pm 2,3$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) par rapport aux cellules traitées par HA seulement. Les observations étaient similaires chez les PMNL qui ont subi un premier traitement par la NA suivie d'une stimulation subséquente par le PMA. L'activité PKC de ces cellules (138 ± 2 pmol/ 2×10^5 cellules/min) a augmenté près de deux fois par rapport à l'activité des cellules témoins stimulées par NA seulement ($74,1 \pm 4,2$ pmol/ 2×10^5 cellules/min). Finalement, les cellules

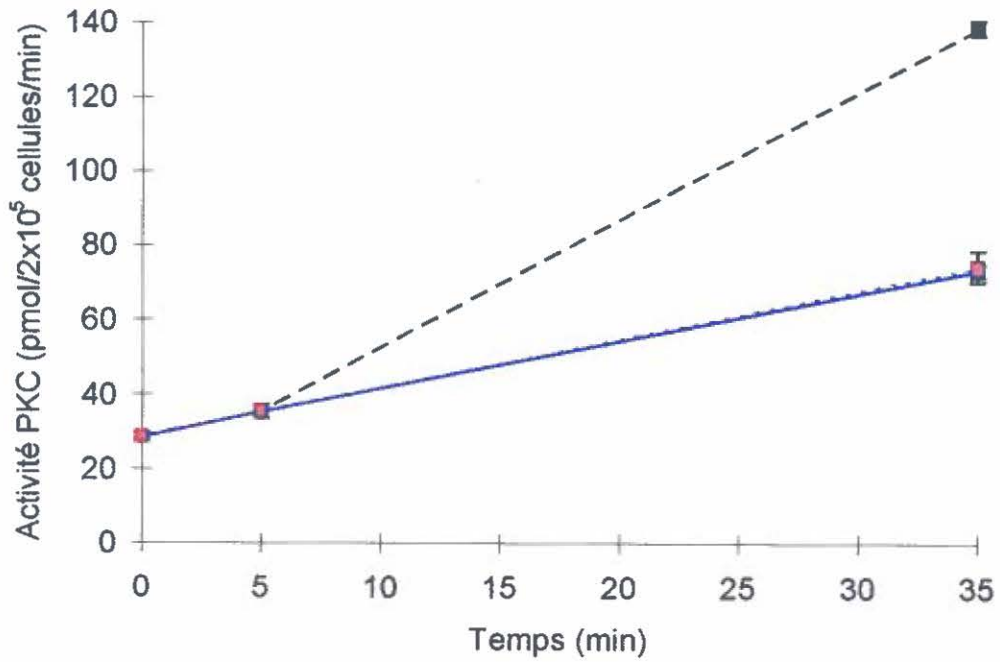
Figure 15. Compétition entre les divers stimulateurs pour un site cellulaire pour activer la PKC des PMNL.

Les cellules ont d'abord été traitées par 0,25 µg de HA (figure a) ou 0,25 µg de NA (figure b) pour une période de 5 min à 37°C. Après ce premier traitement, un échantillon de cellules a été prélevé et l'activité PKC a été mesurée. Par la suite une quantité de 0,25 µg de HA —■— ou de NA ----■---- ou une dose de 1 µM de PMA ---■--- ont été ajoutées pour une période additionnelle de 30 min et l'activité PKC a été mesurée de nouveau. Les valeurs représentent l'activité PKC totale sur le substrat Ac-MBP (4-14) et sont la moyenne de trois expériences faites en duplicata.

a



b



qui ont reçu un premier traitement par NA suivie d'une stimulation subséquente par la HA, n'ont montré aucune augmentation d'activité significative ($73 \pm 1,8$ pmol/ 2×10^5 cellules/min) par rapport aux cellules stimulées par NA seulement.

DISCUSSION

La PKC est une enzyme impliqué dans la transduction de plusieurs signaux qui peuvent induire une réponse immunitaire ou un mécanisme de défense. La phosphorylation de protéines, catalysée par la PKC, est un procédé majeure dans l'activation des PMNL. Hartshorn et al., (1992b; 1990), ont rapporté que le virus influenza active les PMNL, tel que démontré par l'induction du métabolisme oxydatif, en employant des mécanismes de transduction impliquant la PKC. Nos résultats correspondent avec les leurs puisque nous avons démontré le potentiel que possède le virus influenza de type A pour stimuler l'activité PKC des PMNL humains. Cependant, les composantes virales responsables de cette augmentation d'activité PKC des PMNL sont inconnues. Nous avons donc examiné le potentiel de diverses protéines du virus influenza à stimuler l'activité PKC des PMNL humains.

Les résultats démontrent que nous avons identifié trois protéines du virus influenza, soit la HA, la NA et la M, qui possèdent le potentiel d'activer la PKC des PMNL humains. La dose optimale de glycoprotéines pour activer la PKC des PMNL a d'abord été déterminée. Tel que démontré à la figure 10, l'activité de la PKC est dépendante de la dose de glycoprotéines. Le profil des courbes qui est similaire pour les deux glycoprotéines, démontre que ces dernières ont un potentiel identique

pour activer l'enzyme. L'augmentation linéaire de l'activité en fonction de la dose de glycoprotéines témoigne de la pureté des stimulateurs utilisés et démontre par le fait même la présence d'une réaction enzymatique (Eymery, 1987). Cette augmentation d'activité en fonction de la dose est également indicatrice de l'implication probable d'un site cellulaire et la présence d'un plateau au delà de la dose optimale, suggère que nous avons obtenu, à 0,25 µg, une dose de saturation. Goodwin et Weinberg, (1982) ont rapporté un phénomène similaire lorsqu'ils ont mesuré l'activité de la NADPH oxidase chez les PMNL humains mis en présence d'un stimulateur de la PKC, le phorbol-12,13-dibutyrate. Ils ont démontré une augmentation de l'activité NADPH oxydase qui est devenue stable au moment de saturation du récepteur.

L'effet du virus et des glycoprotéines sur l'activité PKC en fonction du temps de stimulation a également été déterminé. Les résultats montrent que le temps de stimulation est un élément qui influence l'activité PKC. Chez les cellules traitées par le virus ou les glycoprotéines l'activité de l'enzyme augmente en fonction du temps pour atteindre une activation maximale après 30 min de stimulation. Cependant, une perte d'activité est observée après 45 min et les raisons de cette diminution nous sont inconnues. Des travaux indiquent toutefois que des inhibiteurs endogènes, présents chez les neutrophiles, ou la dégradation de l'enzyme

par des protéases due à une activation chronique, pourraient être responsables de cette chute d'activité (Balazovich *et al.*, 1986; Ballester et Rosen, 1985). Le rôle de cette dégradation au niveau de la régulation des fonctions cellulaires n'est toujours pas déterminé clairement (Pears, 1995; Hug et Sarre, 1993).

La portion ou la propriété des protéines, qui est responsable de l'augmentation d'activité PKC, nous est inconnue. Cependant, des propriétés importantes qui ne paraissent pas impliquées dans le processus d'activation de la PKC ont été identifiées. D'abord, les résultats présentés au tableau III indiquent que la protéine M, une composante majeure du virus influenza, lorsqu'elle est utilisée dans les mêmes conditions que les glycoprotéines, a un potentiel aussi élevé que ces dernières pour stimuler l'activité PKC des PMNL humains. Puisque les deux types de protéines, glycosylées (HA et NA) et non glycosylée (M), ont un potentiel de stimulation similaire, les oligosaccharides présents sur HA et NA ne joueraient donc pas de rôle critique dans l'activation de la kinase. À ce jour, aucun rôle spécifique n'est attribué aux oligosaccharides dans l'activation d'enzymes membranaires par des signaux externes, puisque plusieurs protéines non glycosylées peuvent provoquer une augmentation d'activité chez ces enzymes. Little *et al.*,

(1994) et Pfeffer et al., (1990) ont démontré le potentiel que possède l'interféron (INF)- α , une protéine non glycosylée, pour activer la NADPH oxydase et la PKC chez les macrophages et les PMNL. Arora et Henrichon (1994), ont également démontré que la protéine M du virus influenza stimule l'activité NADPH oxydase des PMNL. Deuxièmement, les résultats présentés au tableau IV indiquent que les protéines biologiquement actives ont un potentiel similaire à celui des protéines dépourvues de leur activité biologique pour activer la PKC des PMNL. Il nous a donc été possible de conclure que l'activation de la PKC par les glycoprotéines est indépendante de l'activité hémagglutinante de la HA et de l'activité enzymatique de la NA. Considérant le rôle clé que joue la PKC dans l'activation de la NADPH oxydase, ces résultats correspondent avec ceux rapportés par Arora et Henrichon (1994) puisque cette équipe a démontré que l'activation de la NADPH oxydase est également indépendante de l'activité biologique des glycoprotéines.

Le fait que des protéines différentes possèdent un potentiel identique pour stimuler l'activité PKC peut laisser croire à la présence de stimulateurs non spécifiques dans les échantillons de protéines. Nous pouvons toutefois exclure que des impuretés, présentes dans les échantillons de protéines, soient responsables de l'augmentation d'activité

observée car les résultats démontrent que cette augmentation d'activité est spécifique aux protéines virales. D'abord, les cellules ont été incubées en présence de la protéine BSA. Cette protéine qui a subi le même traitement que les protéines virales, ne provoque pas d'augmentation d'activité significative par rapport aux cellules non stimulées. Deuxièmement, cette spécificité a été confirmée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines. Puisque les PMNL possèdent des récepteurs pour les portions Fc des immunoglobulines (Roitt et al., 1989), nous avons donc utilisé les fragments F(ab')₂ afin d'éviter toute forme d'interférence. L'utilisation d'anticorps servant à démontrer la spécificité de protéines virales à induire une réponse cellulaire a déjà été rapportée. Arora et al., (1984), ont démontré que des anticorps dirigés contre les glycoprotéines du virus influenza inhibent le potentiel de celles-ci à stimuler l'activité cytotoxique ces cellules NK. Quant à nos résultats, ils indiquent que l'activité PKC des cellules stimulées par le virus ou les glycoprotéines est inhibée lorsque ces composantes sont complexées à des anticorps, ce qui démontre la spécificité des glycoprotéines à stimuler la PKC. Les anticorps qui forment un complexe avec les glycoprotéines, empêchent peut-être celles-ci de se coupler à un site sur la cellule ou bien ils bloquent, sur les glycoprotéines, le site qui est responsable de l'activation de la PKC. Le fait que les anticorps n'inhibent pas le potentiel de la protéine M et du PMA, appuie

ces hypothèses en plus de permettre un contrôle sur la spécificité des anticorps. Troisièmement, il n'est pas étonnant que différentes protéines possèdent le potentiel d'activer la PKC puisqu'il a déjà été démontré, chez les macrophages, que les molécules d'INF I et II, deux protéines distinctes, ont le potentiel de stimuler l'activité PKC (Pfeffer et al., 1990; Yap et al., 1986). Finalement, les protéines virales étudiées dans ce projet ont été rapportées pour le potentiel qu'elles ont de stimuler l'activité de la NADPH oxydase des PMNL (Arora et Henrichon, 1994) et l'activité des cytokines TNF et IL-1 chez les macrophages (Arora et Houde, 1991; Houde et Arora, 1990; 1989). Considérant que l'activation de la PKC est prérequis à de telles réponses immunitaires ou mécanismes de défense (Shapira et al., 1994; Wolfson et al., 1985), il n'est donc pas surprenant d'observer une stimulation de l'activité PKC par les protéines virales HA, NA et M.

Il est à noter également que les variations inter-expériences quant aux niveaux d'activation observés chez les cellules stimulées par la HA, la NA et la M ne sont pas causées par la présence d'impuretés dans les échantillons de protéines. Puisque la pureté des protéines virales était un critère important pour la détermination de leur potentiel à activer la PKC, une électrophorèse sur gel de polyacrylamide a donc été effectuée avant

de débiter les expériences. La coloration au nitrate d'argent montre le profil des trois protéines virales et a permis par le fait même de confirmer la pureté du matériel employé. De plus, on observe la même tendance pour les valeurs obtenues pour le PMA, un produit provenant directement du manufacturier. Il est donc possible que les conditions d'entreposage des divers stimulateurs aient affecté le potentiel de ces derniers à stimuler l'activité PKC. De plus, l'isolement des PMNL peut être une explication. Afin d'obtenir une bonne séparation, il nous était quelques fois nécessaire de prolonger la centrifugation au moment de l'isolement des cellules, même lorsque celles-ci provenaient de donneurs en santé. De telles conditions peuvent affecter certaines fonctions des PMNL sans pour autant diminuer la viabilité cellulaire (Ferrante et Thong, 1980), ce qui pourrait donc résulter en une augmentation d'activité PKC moins importante. Également, il est important de souligner que ces différences inter-expériences n'affectent pas les conclusions que l'on peut tirer des résultats obtenus, puisque les variations des niveaux d'activation sont observées chez tous les stimulateurs utilisés.

La phosphorylation de protéines, par les protéines kinases, est chez les PMNL, une étape cruciale dans la transduction de signaux. Plusieurs types de kinases ont été décrites chez ces phagocytes, entre autres, les c

et nPKC (Wenzel-Seifert et al., 1994; Majumdar et al., 1993; Smallwood et Malawista, 1992). L'activation de ces kinases par divers stimulateurs est associée à une redistribution de l'enzyme du cytosol à la membrane cellulaire et cette translocation est une étape obligatoire pour leur activation (Pontremoli et al., 1986). La translocation peut donc être utilisée comme un index de l'activation enzymatique. L'identification de la PKC comme enzyme responsable de l'activité détectée s'appuie sur les arguments suivants. D'abord, les résultats démontrent que la stimulation des cellules par le virus et les glycoprotéines provoque la translocation de l'enzyme, du cytosol à la membrane, car une augmentation de l'activité membranaire est observée parallèlement à une diminution de l'activité cytosolique. La stabilité de l'activité cytosolique et de l'activité membranaire chez les cellules témoins traitées au PBS, confirme que la translocation a été enclenché suite au traitement subit par les cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Christiansen et Borregaard (1989), ainsi que Wolfson et al., (1985) qui ont démontré que la localisation de la PKC chez les neutrophiles non stimulés se trouve au niveau du cytosol et un traitement des cellules par le PMA provoque l'association de l'enzyme à la fraction membranaire des cellules. Également, la translocation de la PKC induite par des protéines virales a déjà été rapporté. Rott et al., (1995), ont démontré que la HA du virus influenza induit une augmentation de l'activité PKC membranaire chez les

lymphocytes B parallèlement à une diminution de l'activité cytosolique. Deuxièmement, les trois familles de PKC possèdent dans leur région V1 une séquence permettant de contrôler leur activité en inhibant l'autophosphorylation ou la phosphorylation de substrats. Cette portion comprise entre les résidus 19 à 36 porte le nom de pseudosubstrat prototipe (Stabel et Parker, 1991). En tenant compte de cette caractéristique, un peptide synthétique correspondant à la séquence du pseudosubstrat prototipe a été utilisé pour inhiber l'activité PKC chez les cellules stimulées. L'observation d'une diminution significative de l'activité en présence de l'inhibiteur confirme que la PKC est l'enzyme qui a été détectée.

Le rôle activateur du calcium sur les cPKC est bien documenté (Nishizuka, 1988; Kishimoto et al., 1980; Takai et al., 1979). La source de calcium peut provenir du milieu extracellulaire et l'utilisation de chélateur tel que l'EGTA inhibe l'effet du calcium (Nishizuka, 1988). En tenant compte de cette observation, nos conditions expérimentales ont permis d'identifier deux isoformes de la famille des cPKC qui sont activées par les stimulateurs utilisés au cours de ce projet. Les résultats montrent une diminution d'activité PKC lorsque l'EGTA est incorporé au milieu réactionnel, suggérant un rôle pour les PKC α et/ou β dans l'activation des

neutrophiles par le virus ou ses protéines purifiées. L'isoforme γ est exclue car elle n'est présente que dans le cerveau et la moelle épinière (Kikkawa *et al.*, 1989). Finalement, un substrat spécifique a été utilisé. Le substrat Ac-MBP (4-14) qui se compose d'une séquence de 10 acides aminés provenant de la protéine basique de la myéline permet la détection sélective des PKC α , β et γ (Yasuda *et al.*, 1990). La phosphorylation de ce substrat corrobore donc l'assertion mentionnée plus haut.

Le ou les mécanismes impliqués dans l'activation de la PKC par les protéines virales reste à déterminer. Toutefois, l'allure des courbes dose-réponse, l'inhibition du potentiel des glycoprotéines à stimuler la PKC par les anticorps et le phénomène de translocation décrit précédemment, suggèrent que la stimulation n'était pas due à un phénomène non spécifique provenant d'une perturbation de la membrane des PMNL. La possibilité que l'activation de la kinase par les glycoprotéines implique un site cellulaire a donc été considérée. Nous avons d'abord vérifié, par des études de compétition, si différents sites étaient utilisés par la HA et la NA. Les résultats démontrent que les glycoprotéines compétitionnent pour le même site car une brève incubation des cellules avec la HA inhibe toute activation subséquente avec la NA puisque l'activité PKC de ces cellules est identique à l'activité des cellules stimulées par HA seulement.

Alternativement, si les récepteurs ciblés par ces deux agents avaient été différents, les cellules traitées par HA et subséquemment stimulées par la NA, auraient montrer une activité PKC plus élevée que celle des cellules stimulées par HA seulement. Ces résultats ont été confirmés avec l'expérience inverse, soit une première stimulation par la NA suivie d'une stimulation additionnelle par la HA. Par ailleurs, le récepteur pour le PMA est connu. Ce produit provoque la translocation de la PKC cytosolique à la membrane en agissant directement sur un site spécifique de l'enzyme (Nishihira et O'Flaherty, 1985). Les résultats démontrent qu'il n'y a pas de compétition entre les glycoprotéines et le PMA ce qui indique que l'activation de la PKC par les glycoprotéines est initiée suite à une interaction avec un autre site plutôt qu'une interaction directe avec la kinase. Il n'est toutefois pas surprenant que des molécules différentes agissent sur des sites cellulaires différents afin de provoquer des réponses cellulaires identiques. La stimulation des neutrophiles par le TNF- α et par un neurotransmetteur nommé la substance P, agissent via des récepteurs différents et provoquent une réponse cellulaire identique, soit la phosphorylation de substrats résultant en l'activation des neutrophiles (Lloyds et al., 1995).

Finalement, l'implication du site utilisé par le virus influenza au moment de l'infection a été vérifié. Ce virus se lie au PMNL par l'entremise de sa HA à des récepteurs composés de résidus d'acide sialique (Daigneault et al., 1992). Si un site cellulaire est effectivement impliqué dans l'activation de la PKC par les protéines virales, ce dernier est différent du site d'attachement de la HA puisque les résultats indiquent que la HA dépourvue de son activité hémagglutinante, provoque une augmentation de l'activité PKC similaire à la HA dotée de son activité biologique.

CONCLUSION

La littérature présente la PKC comme une protéine qui joue un rôle crucial dans la transduction de signaux qui peuvent mener des mécanismes de défense ou à des réponses immunitaires. Chez les neutrophiles, l'activation de la PKC est prérequise à l'induction du métabolisme oxydatif (Wolfson et al., 1985). Nos résultats précédents démontrent que les glycoprotéines du virus grippal ont le potentiel de stimuler le métabolisme oxydatif de ces phagocytes. Considérant le rôle clé que joue la PKC dans l'induction de ce mécanisme de défense, cette recherche avait donc comme objectif d'étudier l'effet des protéines du virus grippal sur l'activité PKC des neutrophiles humains.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier trois protéines du virus grippal, soit la HA, la NA et la M, qui ont le potentiel d'activer la PKC des PMNL humains. L'activation de la PKC par les glycoprotéines est indépendante de l'activité hémagglutinante de la HA et de l'activité enzymatique de la NA et les oligosaccharides présents sur ces glycoprotéines ne paraissent pas jouer de rôle critique dans l'activation de la PKC.

La phosphorylation d'un substrat synthétique spécifique à l'enzyme, la dépendance au calcium et l'inhibition par un inhibiteur spécifique

indiquent que les isoformes α et/ou β sont impliquées dans l'activation des PMNL par le virus influenza. Toutefois, le ou les mécanismes impliqués dans l'activation de la PKC par les protéines virales sont inconnus. Les résultats suggèrent cependant l'implication d'un site cellulaire qui est commun à la HA et à la NA et qui est différent du site d'attachement de la HA.

La stimulation de l'activité PKC des cellules phagocytaires, par les protéines purifiées du virus grippal, est un phénomène qui n'a pas encore été décrit dans la littérature. Toutefois, l'activation de cette enzyme pourrait être particulièrement intéressante, étant donné le rôle clé qu'elle joue dans l'induction de réponses immunitaires et de mécanismes de défense qui contribuent à la défense contre une infection grippale.

REMERCIEMENTS

Je désire d'abord exprimer ma reconnaissance à mon directeur de projet, le docteur Jit Arora, pour avoir accepté la direction de mes travaux. La confiance qu'il a eu en moi, sa disponibilité et surtout sa patience ont été très appréciées aux cours des années passées dans son laboratoire. Jit m'a donné la chance de vivre une expérience inestimable.

Les docteurs Jenny Phipps et Mustapha Ennaji m'ont été d'une aide très précieuse. Je tiens à les remercier pour l'accueil que j'ai eu au Conseil National de Recherche du Canada (CNRC) à Ottawa et pour leurs conseils judicieux sur la PKC. Je remercie également le docteur Balu Chakravarthy du CNRC pour ses précieux conseils et pour m'avoir enseigné les méthodes nécessaires à l'étude de la PKC.

Je ne peux oublier l'aide grandement appréciée d'un bon ami, Marc Henrichon. Je lui dois l'excellente formation technique que j'ai acquise. Son expérience et sa disponibilité ont facilité mes années d'études passées à l'institut. Je garde de très bons souvenirs des nombreuses heures de travail passées ensemble, de nos pauses café sur le perron de l'institut et de nos discussions de toutes sortes.

Je remercie spécialement Mme Elyse Bégin, les nombreux donateurs de sang de l'institut Armand-Frappier ainsi que la fondation Armand-Frappier, sans qui il m'aurait été difficile de poursuivre mon projet de recherche.

Enfin, j'adresse mes remerciements à Eric, mon conjoint, qui a grandement contribué à faciliter toutes mes années d'études par sa patience, son soutien et ses encouragements.

BIBLIOGRAPHIE

ABRAMSON, J.S., D.S. LYLES, K.A. HELTER et D.A. BASS. 1982. Influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Infect. Immun.* **37**: 794-799.

ABRAMSON, J.S. et E.L. MILLS. 1988. Depression of neutrophil function induced by viruses and its role in secondary microbial infection. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 326-341.

ABRAMSON, J.S., M.P. WAGNER, E.P. RALSTON, Y. WEI et J.G. WHEELER. 1991. The ability of polymorphonuclear leukocyte priming agents to overcome influenza A virus-induced cell dysfunction. *J. Leukocyte Biol.* **50**: 160-166.

ADA, G.E. et P.D. JONES. 1986. The immune response to influenza infection. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **128**: 1-54.

ADEREM, A. 1992. The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* **71**: 713-716.

AIR, G.M. 1979. Nucleotide sequence coding for the "signal peptide" and N terminus of the hemagglutinin from an asian (H2N2) strain of influenza virus. *Virology* **97**: 468-472.

AIR, G.M., M.C. ELS, L.E. BROWN, W.G. LAVER et R.G. WEBSTER. 1985. Location of antigenic sites on the three-dimensional structure of the influenza N2 virus neuraminidase. *Virology* **145**: 237-248.

AIR, G.M., W.G. LAVER et R.G. WEBSTER. 1987. Antigenic variation in influenza viruses. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **8**: 20-59.

ANDREWS, A.T. 1981. Electrophoresis. Theory, techniques and biochemical and clinical applications. Clarendon Press. Oxford. 229 pages.

ARBATSKY, N.P., V.A. DEREVITSKAYA, A.O. ZHELTOVA, N.K. KOHELTOV, L.M. LIKHOSHERSTOV, S.N. SENCHENKOVA et D.V. YURTOV. 1988. The carbohydrate chains of influenza virus hemagglutinin. *Carbohydrate Res.* **178**: 165-181.

ARORA, D.J.S. 1993. Administration of inactivated and detergent-treated influenza virus to mice before virus challenge reduces mortality. *J. Med. Virol.* **41**: 85-89.

ARORA, D.J.S. et L.F. GABRIEL. 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. et M. HENRICHON. 1994. Superoxide anion production in influenza protein-activated NADPH oxydase of human polymorphonuclear leukocyte. *J. Infect. Dis.* **169**: 1129-1133

ARORA, D.J.S. et M. HOUDE. 1991. Modulation of murine macrophage responses stimulated with influenza glycoproteins. *Can. J. Microbiol.* **38**: 188-192.

ARORA, D.J.S., M. HOUDE, D.M. JUSTEWICZ et R. MANDEVILLE. 1984. In vitro enhancement of human natural cell-mediated cytotoxicity by purified influenza virus glycoproteins. *J. Virol.* **52**: 839-845.

ARORA, D.J.S., P. TREMBLAY, R. BOURGAULT et S. BOILEAU. 1985. Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid. *Anal. Biochem.* **144**: 189-192.

BACHER, N., Y. ZISMAN, E. BERENT et E. LIVNEH. 1991. Isolation and characterization of PKC-L, a new member of the protein kinase C-related family specifically expressed in lung, skin and heart. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 126-133.

BALAZOVICH, K.L., J.E. SMOLEN et L.A. BOXER. 1986. Endogenous inhibiteur of protein kinase C: association with human peripheral blood neutrophils but not with specific granule-deficient neutrophils or cytoplasts. *J. Immunol.* **137**: 1665-1670.

BALLESTER, R. et O.M. ROSEN. 1985. Fate of immunoprecipitable protein kinase C in GH3 cells treated with phorbol 12-myristate 13-acetate. *J. Biol. Chem.* **260**: 15194-15199.

BARCENA, J., M. OCHOA, S. DELALUNA, J.A. MELERO, A. NIETO, J. ORTIN et A. PORTELA. 1994. Monoclonal antibodies against virus PB2 and NP polypeptides interfere with initiation step of viral mRNA synthesis in vitro. *J. Virol.* **68**: 6900-6909.

BEATON A.R. et R.M. KRUG. 1986. Transcription antiterminaison during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6282-6286.

BLOK, J., G.M. AIR, W.G. LAVER, C.W. WARD, G.G. LILLEY, E.F. WOODS, C.M. ROXBURGH et A.S. INGLIS. 1982. Studies on the size, chemical composition, and partial sequence of the neuraminidase (NA) from type A influenza viruses show that the N-terminal region of the NA is not processed and serves to anchor. *Virology* **119**: 109-121.

BUCHNER, K. 1995. Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus. *Eur. J. Biochem.* **228**: 211-221.

BULLOUGH, P.A., F.M. HUGHSON, J.J. SKEHEL et D.C. WILEY. 1994. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature* **371**: 37-43.

CARR, C.M. et P.S. KIM. 1994. Flu virus invasion: halfway there. *Science* **266**: 234-236.

CASSIDY, L.F., D.S. LYLES et J.S. ABRAMSON. 1989. Depression of polymorphonuclear leukocyte function by purified influenza virus hemagglutinin and sialic acid binding lectins. *J. Immunol.* **142**: 4401-4406.

CHAKRAVARTHY, B.R., A. BUSSEY, J.F. WITHFIELD, M. SIKORSKA, R.E. WILLIAMS et J.P. DURKIN. 1991. The direct measurement of protein kinase C (PKC) activity in isolated membranes using a selective peptide substrate. *Anal. Biochem.* **196**: 144-150.

CHAKRAVARTHY, B.R., R. TREMBLAY, P. MCDONALD, V. KRISMANOVIC, J.F. WHITFIELD et P. DURKIN. 1992. The activation of inactive membrane-associated protein kinase C is associated with DMSO-induced erythroleukemia cell differentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1136**: 83-90.

CHOPPIN, P.W. et R.W. COMPANS. 1975. "The structure of influenza virus." dans Kilbourne, E.D. (ed): *The influenza viruses and influenza*. New York. Acad. Press. 15-52.

CHOPPIN, P.W., R.W. COMPANS, A. SCHEID, J.J. MCSHARRY et S.G. LAZAROWITZ. 1972. "Structure and assembly of viral membranes". dans Fox, C.F. (ed.): *Membranes Research. ICN-UCLA Symposium on molecular biology*, vol. 1. New York. Academic Press. 163-179.

CHOTHIA, C., M. LEVITT et D. RICHARDSON. 1977. Structure of proteins: packing of alpha-helices and pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 4130-4134.

- CHRISTIANSEN, N.O. et N. BORREGAARD. 1989. Translocation of protein kinase C to subcellular fractions of human neutrophils. *Scand. J. Immunol.* **29**: 409-416.
- COLMAN, P.M. et C.W. WARD. 1985. Structure and diversity of influenza virus neuraminidase. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **114**: 177-255.
- COLMAN, P.M., J.N. VARGHESE et W.G. LAVER. 1983. Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**: 41-44.
- CONCANNON, P., I.W. CUMMINGS et W.A. SALSER. 1984a. Nucleotide sequence of the influenza virus A/USSR/90/77 hemagglutinin gene. *J. Virol.* **49**: 276-278.
- CONCANNON, P., C.J. KWOLEK et W.A. SALSER. 1984b. Nucleotide sequence of the influenza virus A/USSR/90/77 neuraminidase gene. *J. Virol.* **50**: 654-656.
- COUSSENS, L., L. RHEE, P.J. PARKER et A. ULRICH. 1987. Alternative splicing increases the diversity of the human protein kinase C family. *DNA* **6**: 389-394.
- COUSSENS, L., P.J. PARKER, L. RHEE, T.L. YANG-FENG, E. CHEN, M.D. WATERFIELD, U. FRANCKE et A. ULLRICH. 1986. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science* **23**: 859-866.
- CURNUTTE, J.T., R.W. ERICKSON, J. DING et J.A. BADWEY. 1994. Reciprocal interactions between protein kinase C and components of the NADPH oxidase complex may regulate superoxide production by neutrophils stimulated with a phorbol ester. *J. Biol. Chem.* **269**: 10813-10819.
- DAIGNEAULT, D.E., K.L. HARTSHORN, L.S. LIU, G. ABBRUZZI, M.R. WHITE, S.K. OH et A.I. TAUBER. 1992. Influenza A virus binding to human neutrophils and cross linking requirements for activation. *Blood* **80**: 3227-3234.
- DEKKER, L.V., P. MCINTYRE et P.J. PARKER. 1993. Mutagenesis of the regulatory domain of rat protein kinase C- η a molecular basis for restricted histone kinase activity. *J. Biol. Chem.* **268**: 19498-19504.

DEVALIA, V., N.S.B. THOMAS, P.J. ROBERTS, M.H. JONES et D.C. LINCH. 1992. Down regulation of human protein kinase C α is associated with terminal neutrophil differentiation. *Blood* **80**: 68-76.

DONOFRIO, J.C., J.D. COONROD, V. KARATHANAKIS et K.W. COELINGH. 1986. Electroelution for purification of influenza virus A matrix protein for use in immunoassay. *J. Virol. Meth.* **13**: 107-120.

DOWNEY, G.P., T. FUKUSHIMA, L. FIALKOW et T.K. WADDELL. 1995. Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. *Sem. Cell Biol.* **6**: 345-356.

EYMERY, D. 1987. *Biochimie descriptive et métabolique*. Éditions Le Griffon D'argile. Québec. 381 pages.

FARAGO, A. et Y. NISHIZUKA. 1990. Protein kinase C in transmembrane signalling. *Febs Letters* **268**: 350-354.

FERRANTE, A. et THONG, Y.H. 1980. Optimal conditions for simultaneous purification of mononuclear and polymorphonuclear leucocytes from human peripheral blood by hypaque-ficoll method. *J. Immunol. Meth.* **99**: 109-117.

FIELDS, A.P., G.R. PETIT et W.S. MAY. 1988. Phosphorylation of lamin B at the nuclear membrane by activated protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **263**: 8253-8260.

FUJISAWA, S.H., M. TANIGUCHI, Y. ZINNAKA et K. NOMOTO. 1987. Protective mechanisms against pulmonary infection with influenza virus. I. Relative Contribution of polymorphonuclear leukocytes and of alveolar macrophages to protection during the early phase of intranasal infection. *J. Gen Virol.* **88**: 425-432.

GAMMELIN, M., J. MANDLER et C. SCHOLTISSEK. 1989. Two subtypes of nucleoproteins (NP) of influenza A virus. *Virology* **170**: 71-89.

GOLDSMITH, E.J. et M.H. COBB. 1994. Protein kinases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**: 833-840.

GOODWIN, B.J. et J.B. WEINBERG. 1982. Receptor-mediated modulation of human monocyte, neutrophil, lymphocyte, and platelet function by phorbol diesters. *J. Clin. Invest.* **70**: 699-706.

GOULD, K.G., H. SCOTNEY, A.R. TOWNSEND, J. BASTIN et G.G BROWNLEE. 1987. Mouse H-2k restricted cytotoxic T cells recognize antigenic determinants in both the HA1 and HA2 subunits of the influenza A/PR/8/34 hemagglutinin. *J. Exp. Med.* **166**: 693-701.

GRIFFIN, J.A., S. BASAK et R.W. COMPANS. 1983. Effects of hexose starvation and the role of sialic acid in influenza virus release. *Virology* **125**: 324-334.

HARTSHORN, K.L., A.B. KARNAD et A.I. TAUBER. 1990. Influenza A virus and the neutrophil: a model of natural immunity. *J. Leukocyte Biol.* **47**: 176-186.

HARTSHORN, K.L. et A.I. TAUBER. 1989. The influenza virus-infected phagocyte. A model of deactivation. *Hematol./ Oncol. Clinics North Am.* **2**: 301-315.

HARTSHORN, K.L., D.E. DAIGNEAULT, M.R. WHITE et A.I. TAUBER. 1992a. Anomalous features of human neutrophil activation by influenza A virus are shared by related viruses and sialic acid binding lectins. *J. Leukocyte Biol.* **51**: 230-236.

HARTSHORN, K.L., D.E. DAIGNEAULT, M.R. WHITE, M. TUVIN, J.L. TAUBER et A.I. TAUBER. 1992b. Comparaison of influenza A virus and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine activation of the human neutrophil. *Blood* **79**: 1049-1057.

HARTSHORN, K.L., E.C. CROUCH, M.R. WHITE, E. CHANG, A.I. TAUBER et K. SASTRY. 1994. Evidence for a protective role of pulmonary surfactant protein D (SP-D) against influenza A viruses. *J. Clin. Invest.* **94**: 311-319.

HARTSHORN, K.L., K.B.M REID, M.R. WHITE, J.C. JENSENIUS, S.M. MORRIS, A.I. TAUBER et E. CROUCH. 1996. Neutrophil deactivation by influenza A viruses: mechanisms of protection after viral opsonization with collectins and hemagglutinin-inhibiting antibodies. *Blood* **87**: 3450-3461.

HARTSHORN, K.L., L.S., LIU, R. WHITE, M.M. KAZHDAN, J.L. TAUBER et A.I. TAUBER. 1995. Neutrophil deactivation by influenza A virus. *J. Immunol.* **154**: 3952-3960.

HARTSHORN, K.L., M. COLLAMER, M. AUERBACH, J.B. MYERS, N. PAVLOTSKY et A.I. TAUBER. 1988. Effects of influenza A virus on human neutrophil calcium metabolism. *J. Immunol.* **141**: 1295-1301.

- HARTSHORN, K.L., M. COLLAMER, M.R. WHITE, J.H. SCHWARTZ et A.I. TAUBER. 1990. Characterization of influenza A virus activation of the human neutrophil. *Blood* **75**: 218-226.
- HENDERSON, L.E., S. OROSZLAN et W. KONIGSBERG. 1979. A micromethod for complete removal of dodecyl sulfate from proteins by ion-pair extraction. *Anal. Biochem.* **93**: 153-157.
- HENNET, T., H.J. ZILTENER, K. FREI et E. PETERHANS. 1992. A kinetic study of immune mediators in lung of mice infected with influenza A virus. *J. Immunol.* **149**: 932-939.
- HOUDE, M. et D.J.S. ARORA. 1990. Stimulation of tumor necrosis factor secretion by purified influenza virus neuraminidase. *Cellular Immunology* **129**: 104-111.
- HOUDE, M. et D.J.S. ARORA. 1989. Human influenza virus neuraminidase, but not hemagglutinin, induces murine macrophages interleukine-1 in vivo and in vitro. *Immunology Letters* **22**: 41-46.
- HOUSE, C. et B.E. KEMP. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* **238**: 1726-1728.
- HUANG, K.P. et F.L. HUANG. 1986. Conversion of protein kinase C from a Ca^{2+} -dependant to an independant form of phorbol ester-binding protein by digestion with trypsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**: 320-326.
- HUG, H. et F. SARRE. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction. *Biochem. J.* **291**: 329-343.
- JOHANNES, F.J., J. PRESTLE, S. DIETERICH, P. OBERHAGEMANN, G. LINK et K. PFIZENMAIER. 1995. Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu. *European J. Biochem.* **227**: 303-307.
- JOHANNES, F.J., J. PRESTLE, S. EIS, P. OBERHAGEMANN et K. PFIZENMAIER. 1994. PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* **269**: 6140-6148.
- KARASZKIEWICZ, J.W. 1996. Structural diversity in the protein kinase C family, dans *Life technologies Inc. (ed.): FOCUS on protein kinase C isotypes. Cell biology research and developpement* 1-2.

KAWAOKA, Y. et R.G. WEBSTER. 1989. Interplay between carbohydrate in the stalk and the length of the connecting peptide determines the cleavability of influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* **63**: 3296-3300.

KEIL, W., H-D KLENK et R.T. SCHWARZ. 1979. Carbohydrates of influenza virus. III. Nature of oligosaccharides-protein linkage in viral glycoproteins. *J. Virol.* **31**: 253-256.

KEMP, B.E. et R.B. PEARSON. 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 342-346.

KIKKAWA, U., A. KISHIMOTO et Y. NISHIZUKA. 1989. The protein kinase C family: heterogeneity and its implication. *Annu. Rev. Biochem.* **58**: 31-44.

KILBOURNE, E.D. 1987. *Influenza*. Plenum Medical Book Company. New York. 359 pages.

KISHIMOTO, A., N. KALIKAWA, M. SHIOTA et Y. NISHIZUKA. 1983. Proteolytic activation of calcium activated, phospholipid-dependant protein kinase by calcium-dependant neutral protease. *J. Biol. Chem.* **258**: 1156-1164.

KISHIMOTO, A., Y. TAKAI, T. MORI, U. KIKKAWA et Y. NISHIZUKA. 1980. Activation of calcium and phospholipids-dependant protein kinase by diacylglycerol, its possible relation to phosphatidylinositol turnover. *J. Biol. Chem.* **255**: 2273-2276.

KLENK, H.-D. 1991. "Orthomyxoviridae" dans Francki, R.I.B., CM. Fauquet, D.I. Knudson, F. Brown (eds.): *Classification and Nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee on taxonomy of viruses*. New York. Springer-Verlag Wien. 263-272.

KOCHS, G., R. HUMMEL, B. FIEBICH, T.F. SARRE, D. MARME et H. HUG. 1993. Activation of purified human protein kinase C alpha and beta I isoenzymes in vitro by Ca^{2+} , phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochem. J.* **291**: 627-633.

KOENNECKE, I., C.B. BOSCHEK et C. SCHOLTISSEK. 1981. Isolation and properties of a temperature-sensitive mutant (ts 412) of an influenza A virus recombinant with a ts lesion in the gene coding for the nonstructural protein. *Virology* **110**: 16-25.

KRUG, R.M. 1989. "Expression and replication of the influenza virus genome." dans Krug, R.M., H Fraenkel-Conrat, R.R. Wagner (eds.): The influenza viruses. New York: Plenum Press: 89-152.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

LAMB, R.A. 1989. "Gene and proteins of the influenza viruses." dans Krug, R.M, H. Fraenkel-Conrat, R.R. Wagner (eds.): The influenza viruses. New York. Plenum Press: 1-88.

LAMB, R.A. et P.W. CHOPPIN. 1983. The gene structure and replication of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 467-506.

LAVER, W.G. 1978. Crystallisation and peptide maps of neuraminidase "heads" from H2N2 and H3N2 influenza virus strains. *Virology* **86**: 78-87.

LAVER, W.G., G.M. AIR, R.G. WEBSTER, W. GERHARD, C.W. WARD et T.A. DOPHEIDE. 1981. The mechanism of antigenic drift in influenza virus: sequence changes in the haemagglutinin of variants selected with monoclonal hybridoma antibodies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol.* **288**: 313-326.

LAVER, W.G., P.M. COLMAN, R.G. WEBSTER, V.S. HINSHAW et G.M. AIR. 1984. Influenza virus neuraminidase with haemagglutinin activity. *Virology* **13**: 314-324

LAVER, W.G. et R.C. VALENTINE. 1969. Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus, *Virology* **38**: 105-119.

LENTZ, M.R., R.G. WEBSTER et G.M. AIR. 1987. Site-directed mutation of the active site of influenza neuraminidase and implications for the catalytic mechanism. *Biochemistry* **26**: 5351-5358.

LIN, Y.P., L.L. SHU, S. WRIGHT, W.J. BEAN, G.B. SHARP, K.F. SHORTRIDE et R.G. WEBSTER. 1994. Analysis of the influenza virus gene pool of avian species from southern China. *Virology* **198**: 557-566.

LITTLE, R., M.R. WHITE et K.L. HARTSHORN. 1994. Interferon- α enhances neutrophil respiratory burst responses to stimulation with influenza A virus and FMLP. *J. Infect. Dis.* **170**: 802-810.

- LIU C., M.C. EICHELBERGER, R.W. COMPANS et G.M. AIR. 1995. Influenza type A virus neuraminidase does not play a role in viral entry, replication, assembly, or budding. *J. Virol.* **69**: 1099-1106.
- LLOYDS, D., N.P.J. BRINDLE et M.B. HALLETT. 1995. Priming of human neutrophils by tumor necrosis factor- α and substance P is associated with tyrosine phosphorylation. *Immunology* **84**: 220-226.
- MAJUMDAR, S., L.H. KANE, M.W. ROSSI, B.D. VOLP, M.W. NAUSEEF et H.M. KORCHAK. 1993. Protein kinase C isotypes and signal-transduction in human neutrophils: selective substrate specificity of calcium dependant beta-PKC and novel calcium independant nPKC. *Biochim. Biophys. Acta* **1176**: 276-286.
- MAK, N-K., E. SCHILTKNECHT et G.L. ADA. 1983. Protection of mice against influenza virus infection: enhancement of nonspecific cellular responses by *Corynebacterium parvum*. *Cell. Immunol.* **78**: 314-325.
- MALY, F.E. et C.C. SCHÜRER-MALY. 1995. How and why cells make superoxide: the "phagocytic" NADPH oxidase. *NIPS* **10**: 233-238.
- MARSH, M. et A. HELENIUS. 1989. Virus entry into animal cells. *Adv. Virus Res.* **36**: 107-151.
- MARTIN, K. et A. HELENIUS. 1991. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**: 117-130.
- MATSUI, M., R.J. MOOTS, R.J. WARBURTON, A.L. PEACE-BREWER, L.G. TUSSEY, D.G. QUINN, A.J. MCMICHAEL et J.A. FRELINGER. 1995. Genetic evidence for difference between intracellular and extracellular peptide in influenza A virus matrix peptide-specific CTL recognition. *J. Immunol.* **154**: 1088-1096.
- MCCAULEY, J.W. et B.J. MAHY. 1983. Structure and function of the influenza virus genome. *Biochem. J.* **211**: 281-294.
- MUNK, K., E. PRITZER, E. KRETZSHMAR, B. GUTTE, W. GALEN et H-D KLENK. 1992. Carbohydrate masking of an antigenic epitope of influenza virus haemagglutinin independant of oligosaccharide size. *Glycobiology* **2**: 233-240.

MURPHY, B.R. et R.G. WEBSTER. 1990. "Orthomyxovirus." dans Fields B.N., D.M. Knipe (eds.): *Virology* 2^e Ed. New York. Raven press Ltd. 1091-1152.

NAEVE, C.W. et D. WILLIAMS. 1990. Fatty acids on the A/Japan/305/57 influenza virus hemagglutinin have a role in membrane fusion. *EMBO J.* **9**: 3857-3866.

NELSESTUEN, G.L. et M.D. BAZZI. 1991. Activation and regulation of protein kinase C enzymes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **23**: 43-61.

NISHIHIRA, J. et J.T. O'FLAHERTY. 1985. Phorbol myristate acetate receptor in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* **135**: 3439-3447.

NISHIZUKA, Y. 1984. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**: 693-697.

NISHIZUKA, Y. 1988. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**: 661-665.

NISHIZUKA, Y. 1989. Studies and perspectives of the protein kinase C family for cellular regulation. *Cancer.* **61**: 1892-1903.

NISHIZUKA, Y. 1992. Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* **258**: 607-613.

NISHIZUKA, Y. 1995. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB* **9**: 484-496.

ONO, Y., T. FUJII, K. IGARASHI, U. KIKKAWA, K. OGITA et Y. NISHIZUKA. 1988. Nucleotide sequences of cDNAs for α and γ subspecies of rat brain protein kinase C. *Nucleic Acids Res.* **16**: 5199-5200.

ONO, Y., T. FUJII, K. IGARASHI, T. KUNO, C. TANAKA, U. KIKKAWA et Y. NISHIZUKA. 1989a. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4868-4871.

ONO, Y., T. FUJII, K. OGITA, U. KIKKAWA, K. IGARASHI et Y. NISHIZUKA. 1989b. Protein kinase C ζ subspecies from rat brain; its structure, expression and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3099-3103.

OSADA, S.I., K. MIZUNO, T.C. SAIDO, K. SUZUKI, T. KUROKI et S. OHNO. 1992. A new member of the protein kinase C family, nPKC θ , predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 3930-3938.

OSADA, S.I., K. MIZUNO, T.C. SAIDO, Y. AKITA, K. SUZUKI, T. KUROKI et S. OHNO. 1990. A phorbol ester receptor protein kinase C nPKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* **265**: 22434-22440.

PALESE P., K. TOBITA, M. UEDA et R.W. COMPANS. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* **61**: 397-410.

PEARS, C. 1995. Structure and function of the protein kinase C gene family. *J. Biosci.* **20**: 311-332.

PFEFFER, L.M., B. STRULOVICI et A.D. SALTIEL. 1990. Interferon alpha selectively activates the beta isoform of protein kinase C through phosphatidylcholine hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6537-6541.

PHELAN, M.A., R.E. MAYNER, D.J. BUCHER et F.A. ENNIS. 1980. Purification of influenza virus glycoproteins for the preparation and standardization of immunological potency testing reagents. *J. Biol. Stand.* **8**: 233-242.

PHILLIPS, W.A., M. CROATTO et J.A. HAMILTON. 1992. Priming of the respiratory burst of bone marrow-derived macrophages is associated with an increase in protein kinase C content. *J. Immunol.* **149**: 1016-1022.

PINTO, L.H., L.J. HOLSINGER et R.A. LAMB. 1992. Influenza virus M2 protein has an ion channel activity. *Cell* **69**: 517-528.

POMMIER, Y., D. KERRIGAN, K.D. HARTMAN et R.I. GLAZER. 1990. Phosphorylation of mammalian DNA topoisomerase I and activation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265**: 9418-9422.

PONTREMOLI, S., E. MELLONI, M. MICHETTI, F. SALAMINO, B. SPARATORE, O. SACCO et B.L. HORECKER. 1986. Differential mechanism of translocation of protein kinase C to plasma membrane in activated neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **136**: 228-234.

POSSEE, R.D., G.C. SCHILD et N.J. DIMMOCK. 1982. Studies on the mechanism of neutralization of influenza by antibody: evidence that neutralizing antibody (anti-

haemagglutinin) inactivates influenza virus in vivo by inhibiting virion transcriptase activity. *J. Gen. Virol.* **58**: 373-386.

QIAN, X.Y., F. ALONSO-CAPLEN et R.M. KRUG. 1994. Two functional domains of influenza virus NS1 protein are required for regulation of nuclear export of mRNA. *J. Virol.* **68**: 2433-2441.

QIU, Y. et R.M. KRUG. 1994. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). *J. Virol.* **68**: 2425-2432.

ROBERTS, N.J. Jr., A.H. PRILL et T.N. MANN. 1986. Interleukine 1 and interleukine 1 inhibitor production by human macrophages exposed to influenza virus or respiratory syncytial virus. Respiratory syncytial virus is a potent inducer of inhibitor activity. *J. Exp. Med.* **163**: 511-519.

ROBERTS, P.C., W. GARTEN et H-D KLENK. 1993. Role of conserved glycosylation sites in maturation and transport of influenza A -virus hemagglutinin. *J. Virol.* **67**: 3048-3060.

ROBERTSON, J.S., J.S. BOOTMAN, R. NEWMAN, J.S OXFORD, R.S. DANIELS, R.G. WEBSTER et G.C. SCHILD. 1987. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A (H1NI) virus. *Virology* **160**: 31-37.

ROGERS, G.N., J.C. PAULSON, R.S. DANIELS, J.J. SKEHEL, I.A. WILSON et D.C. WILEY. 1983. Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* **304**: 76-78.

ROITT, I., J. BROSTOFF et D. MALE. 1989. *Immunologie fondamentale et appliquée*. 2^e éd. Fridman, W.H.(ed.) Montréal. Medsi/McGraw-Hill 338 pages.

ROTROSEN, D. et J. GALLIN. 1987. Disorders of phagocyte function. *Ann. Rev. Immunol.* **5**: 127-150.

ROTT, O., J. CHARREIRE, M. SEMICHON, G. BISMUTH et E. CASH. 1995. B cell superstimulatory influenza virus (H2-subtype) induces B cell proliferation by a PKC activating Ca²⁺ independant mechanism. *J. Immunol.* **154**: 2092-2103.

- SCHWARZ, R.T., M.F.G. SCHMIDT, U. ANWER et H-D KLENK. 1977. Carbohydrates of influenza virus. I. Glycopeptides derived from viral glycoproteins after labeling with radioactives sugar. *J. Virol.* **23**: 217-226.
- SELBIE, L.A., C. SCHMITZ-PEIFFER, Y. SHENG et T.J. BIDEN. 1993. Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 24296-24302.
- SHAPIRA, L., S. TAKASHIBA, C. CHAMPAGNE, S. AMAR et T.E. VAN DYKE. 1994. Involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinase in lipopolysaccharide-induced TNF-alpha and IL-1 beta production by human monocytes. *J. Immunol.* **153**: 1818-1824.
- SHAPIRO, G. I., G. THEODORE et R.M. KRUG. 1987. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *J. Virol.* **61**: 764-773.
- SHAPIRO, G.I et R.M. KRUG. 1988. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J. Virol.* **62**: 2285-2290.
- SHARMA, P. A.T. EVANS, P.J. PARKER et F.J. EVANS. 1991. NADPH-oxidase activation by protein kinase C isotypes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **177**: 1033-1040.
- SHAW, M.W., N.H. ARDEN et H.F. MAASSAB. 1992. New aspects of influenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**: 74-92.
- SKEHEL, J.J., D.J. STEVENS, R.S. DANIELS, A.R. DOUGLAS, M. KNOSSOW, I.A. WILSON, et D.C. WILEY. 1984. A carbohydrate side chain on hemagglutinins of Hong Kong influenza viruses inhibits recognition by monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 1779-1783.
- SMALLWOOD, J.I. et S.E. MALAWISTA. 1992. Protein kinase C isoforms in human neutrophil cytoplasm. *J. Leukocyte Biol.* **51**: 84-92.
- SPLEPUSHKIN, V.A., J.M. KATZ, R.A. BLACK, W.G. GAMBLE, P.A. ROTA et N.J. COX. 1995. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine* **13**: 1399-1402.

STABEL, S. 1990. "The protein kinase C family." dans Habenicht, A. (ed.): Growth factors, Differentiation factors and Cytokines, 2^e Ed. Berlin. Springer-Verlag. 415-426.

STABEL, S. et P.J. PARKER. 1991. Protein kinase C. *Pharmac. Ther.* **51**: 71-75.

STEINHAUER, D.A., S.A. WHARTON, D.C. WILEY et J.J. SKEHEL. 1991. Deacylation of the hemagglutinin of influenza A/Aichi/2/68 has no effect on membrane fusion properties. *Virology* **184**: 445-448.

TAKAI, Y., A. KISHIMOTO, Y. IWASA, Y. KAWAOKA, T. MORI et Y. NISHIZUKA. 1979. Calcium dependant activation of a multiple functional protein kinase by membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **245**: 3692-3695.

TAUBER, A.I. 1987. Protein kinase C and the activation of human neutrophil NADPH-oxidase. *Blood* **69**: 711-720.

TSURU, S., H. FUJISAWA, M. TANIGUSHI, Y. ZINNAKA et K. NOMOTO. 1987. Mechanism of protection during the early phase of a generalized viral infection. II. Contribution of polymorphonuclear leukocytes to protection against intravenous infection with influenza virus. *J. Gen. Virol.* **68**: 419-424.

VARGHESE, J.N., W.G. LAVER et P.M. COLMAN. 1983. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2,9 Å resolution. *Nature* **303**: 35-40.

VERHOEVEN, A.J., J.H.W. LEUSEN, G.C.R. KESSELS, P.M. HILLARUS, D.B.A. DEBONT et R.M.J. LISKAMP. 1993. Inhibition of neutrophil NADPH-oxidase assembly by a myristoylated pseudosubstrat of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **208**: 18593-18598.

WARD, C.W. 1981. Structure of the influenza virus hemagglutinin. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **94/95**: 1-74.

WARD C.W., J.M. MURRAY, C.M. ROXBURG et JACKSON D.C. 1983. Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate side chains of an asian (N2) influenza virus neuraminidase. *Virology* **126**: 370-375.

WATERFIELD, M.D., G. SCRACE et J.J. SKEHEL. 1981. Disulphide bonds of haemagglutinin of Asian influenza virus. *Nature* **289**: 422-424.

WATSON, F., J. ROBINSON et S.W. EDWARDS. 1991. Protein kinase C dependant and independant activation of the NADPH oxydase of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **266**: 7432-7439.

WEBSTER, R.G., L.E. BROWN at W.G. LAVER. 1984. Antigenic and biological characterization of influenza virus neuraminidase (N2) with monoclonal antibodies. *Virology* **135**: 30-42.

WEBSTER, R.G., W.G. LAVER, G.M. AIR et G.C. SCHILD. 1982. Molecular mechanisms of variation in influenza Viruses. *Nature* **296**: 115-121.

WENZEL-SEIFERT, K., C. SCHÄCHTELE et R. SEIFERT. 1994. N-protein kinase C isozymes may be involved in the regulation of various neutrophils functions. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **200**: 1536-1543.

WHEATER, P.R., H.G. BURKITT et V.G. DANIELS. 1988. *Histologie fonctionnelle*. 2^e Ed. Montréal. Medsi/McGraw-Hill. 35-51.

WHO COLLABORATING CENTERS FOR REFERENCE AND RESEARCH ON INFLUENZA. 1982. Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service/Centers for disease control.

WILEY, D.C., I.A. WILSON et J.J. SKEHEL. 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involment in antigenic variation. *Nature* **289**: 373-378.

WILEY, D.C. et J.J. SKEHEL. 1987. The structure and function of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 365-394.

WILSON, I.A., J.J. SKEHEL et D.C. WILEY. 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 A resolution. *Nature* **289**: 366-373.

WILSON, I.A. et N.J COX. 1990. Structural basis of jmmune recognition of influeza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 737-771.

WOLFSON, M., L.C. MCPHAIL, V.N, NASRALLAH et R. SNYDERMAN. 1985. Phorbol myristate acetate mediates redistribution of protein kinase C in human neutrophils: potential role in the activation of the respiratory burst enzyme. *J. Immunol.* **135**: 2057-2062.

- WOLSTENHOLME, A.J., T. BARRETT, S.T. NICHOL et B.W.J. MAHY. 1980. Influenza virus-specific RNA and protein synthesis in cells infected with temperature-sensitive mutants defective in the genome segment encoding nonstructural proteins. *J. Virol.* **35**: 1-7.
- WRIGHT C.E. et W.G. LAVER. 1978. Preliminary crystallographic data for influenza virus neuraminidase "heads". *J. Mol. Biol.* **120**: 133-136.
- WRIGLEY, N.G. 1979. Electron microscopy of influenza virus. *Br. Med. Bull.* **35**: 35-38.
- WYSOCKAM, P., L.C., EISENLOHR, L. OTVOS Jr., D. HOROWITZ, J.W. YEWDELL, J.R. BENNINK et C.J. HACKETT. 1994. Identification of overlapping class I and class II H-2d-restricted TC determinants of influenza virus N1 neuraminidase that require infectious virus presentation. *Virology* **201**: 86-94.
- YAMAMOTO, K., K. SUZUKI et S. MIZUKO. 1989. Phagocytosis and ingestion of influenza virus by human polymorphonuclear leukocytes in vitro: electromicroscopy studies. *J. Med. Microbiol.* **28**: 191-198.
- YAP, W.H., T.S. TEO, E. MCCOY et Y.H. TAN. 1986. Rapid and transient rise in diacylglycerol concentration in Daudi cells exposed to interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 7765-7769.
- YASUDA, I., A. KISHIMOTO, S. TANAKA, M. TOMINAGA, A. SAKURAI et Y. NISHIZUKA. 1990. A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **166**: 1220-1227.
- YASUDA, J., D.J. BUCHER et A. ISHIHAMA. 1994. Growth control of influenza A virus by M1 protein: analysis of transfectant virus carrying the chimeric M gene. *J. Virol.* **68**: 8141-8146.
- YU, Y.G., D.S. KING et Y.K. SHIN. 1994. Insertion of a coiled-coil peptide from influenza virus hemagglutinin into membranes. *Science* **266**: 274-276.
- ZUCKERMAN, M. 1996. Influenza viruses and vaccines. *Virus and life* **14**: 11-13.

ANNEXE 1

PRÉPARATION DES TAMPONS ET SOLUTIONS

1) Tampon PBS 1X pH 7,4.

Ce tampon est composé de 0,3 M NaCl (Fisher), de 0,005 M KCl (Fisher), de 0,02 M Na₂HPO₄ et de 0,02 M KH₂PO₄.

2) Réactif BCA.

Le réactif BCA comprend la solution A + la solution B dans un rapport 50:1. La solution A contient 0,025 M d'acide bichoninique (BCA, Pierce), 0,2 M de carbonate de sodium hydraté (Baker), 0,01 M de tartrate de sodium (Fisher), 0,1 M d'hydroxyde de sodium (Fisher), et 0,1 M de bicarbonate de sodium (Fisher). Le pH est ajusté à 11,25. La solution B contient 4% de sulfate de cuivre (BDH).

3) Tampon gel de séparation

Ce tampon est composé de 1,5 M Tris-HCl (Sigma) ajusté à pH 8,8 avec 1N HCl (Baker).

4) Tampon gel de tassement

Ce tampon est composé de 0,5 M Tris-HCL ajusté à pH 6,8 avec 1N HCl.

5) Tampon d'échantillon

Ce tampon est composé de 0,125 M Tris-HCl à pH 6,8, de 20% glycérol (Fisher), de 2% SDS (Bio-Rad), de 0,001% bleu de bromophénol (Sigma).

6) Solution d'acrylamide/bis

Cette solution contient 30% d'acrylamide (Bio-Rad) et 2,67% de *N,N'*-bis-méthylène-acrylamide (Bio-Rad).

7) Tampon d'électrophorèse en plaque 5X pH 8,3

Ce tampon est composé de 0,025 M Tris-HCl, de 0,192 M glycine (Bio-Rad) et de 0,1% SDS.

8) Tampon d'électrophorèse en tube

Ce tampon est composé de 0,025 M Tris-HCl et de 0,192 M glycine.

9) Gels de polyacrylamide

Les gels de séparation à 7,5% p/v et 10 % p/v et les gels de tassement à 4 % p/v sont faits selon les recettes suivantes.

	4%	7,5%	10%
Acrylamide	4%	7,5%	10%
Tris pH 8,8	-----	0,375 M	0,375 M
Tris pH 6,8	0,125 M	-----	-----
SDS	0,1%	0,1%	0,1%
Temed (Bio-Rad)	0,1%	0,05%	0,05%
Persulfate d'ammonium (Bio-Rad)	0,05%	0,05%	0,05%

10) Nitrate d'argent ammoniacal

Cette solution est composée de 1.6% d'hydroxyde d'ammonium concentré (BDH), 0,08% d'hydroxyde de sodium (BDH) et 0,8% de nitrate d'argent qui est ajouté goutte à goutte sous agitation constante.

11) Solution développante

Cette solution est composée de 0,005% d'acide citrique (BDH) et de 0,019% de formaldéhyde (Fisher).

12) Tampon d'essai

Ce tampon est composé de 0,05 M Tris-HCl à pH 7,5, de 0,005 M MgCl_2 (Fisher), de 0,0001 M sodium vanadate (BDH), de 0,0001 M sodium pyrophosphate (Fisher), de 0,001 M sodium fluoride (Fisher) et de 0,0001 M phénylméthylsulfonyl fluoride(Sigma).

13) Milieu de lyse hypotonique

Ce milieu est composé de 0,001 M NaHCO_3 (Fisher), de 0,005 M MgCl_2 et de 0,0001 M phénylméthylsulfonyl fluoride.

ANNEXE 2

PRÉSENTATION DES RÉSULTATS À TROIS CONGRÈS

1 Gasse, N. et Arora J. Les glycoprotéines du virus grippal stimulent la protéine kinase C des leucocytes polymorphonucléaires du sang humain. 63^e Congrès de l'ACFAS, Chicoutimi, Québec, Canada. 22 au 26 mai 1995.

2 Gasse N. and Arora D.J.S. Activation and translocation of protein kinase C by influenza virus glycoproteins. 9th International Congress of Immunology, San Francisco, Californie, USA. 23-29 juillet 1995.

3 Gasse, N. et Arora, J. Translocation de la protéine kinase C par les glycoprotéines du virus grippal. 64^e Congrès de L'ACFAS, Montréal, Québec, Canada. 13 au 17 mai 1996.