UNIVERSITÉS FRANCOPHONES

UREF

MANUEL DE TECHNIQUES VIROLOGIQUES

Pierre Payment / Michel Trudel

Presses de l'Université du Québec / AUPELF

MANUEL DE TECHNIQUES VIROLOGIQUES

UNIVERSITÉS FRANCOPHONES

MANUEL DE TECHNIQUES VIROLOGIQUES

Centre de recherche en virologie
Institut Armand-Frappier
Université du Québec
Laval, Québec, Canada

Pierre Payment / Michel Trudel

1989
Presses de l'Université du Québec
Case postale 250, Sillery, Québec G1T 2R1

ISBN 2-7605-0509-X

Tous droits de reproduction, de traduction et d'adaptation réservés © 1989
Presses de l'Université du Québec

Dépôt légal — 4e trimestre 1989
Bibliothèque nationale du Québec
Bibliothèque nationale du Canada
Imprimé au Canada

La loi du 11 mars 1957 n'autorise, aux termes des alinéas 2 et 3 de l'article 41, que «les copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective» d'une part, et, d'autre part, que «les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration», toute représentation ou reproduction, intégrale ou partielle, faite sans le consentement de l'auteur, ou de ses ayants droit ou ayants cause, est illicite (loi du 11 mars 1957, alinéa 1er de l'article 40). Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait une contrefaçon sanctionnée par les articles 425 et suivants du Code pénal.

AVANT-PROPOS

La virologie connaît, sous l'impulsion des progrès en biologie moléculaire et cellulaire, des développements majeurs et les techniques virologiques ne sont plus maintenant l'apanage exclusif des cliniciens ou des chercheurs. Cette pénétration de la virologie dans d'autres disciplines a créé un besoin de données précises sur les techniques de base aussi bien que sur les méthodes les plus avancées. L'absence de manuels rédigés en français constituait une lacune majeure que nous voulions combler afin de permettre à tous de s'initier à ces nouvelles méthodes tout en n'oubliant pas les techniques de base.

Ce livre s'adresse donc aux chercheurs, assistants de recherche et techniciens de laboratoire, aussi bien qu'aux étudiants et diplômés, œuvrant en virologie et dans des domaines connexes. Ils y trouveront des protocoles éprouvés ainsi que les références appropriées leurs permettant d'approfondir les techniques décrites.

Les méthodes présentées par les différents chercheurs de l'Institut Armand-Frappier et par certains de leurs collègues québécois sont à la fois un rappel des méthodes de la virologie fondamentale aussi bien qu'un recueil des méthodes les plus nouvelles de la biologie moléculaire appliquées à la virologie. Tous ces chercheurs sont prêts à guider le lecteur dans l'apprentissage de cette méthodologie: il sera toujours possible de communiquer avec ceux-ci afin d'obtenir toute information supplémentaire.

Nous espérons que cette nouvelle édition de *Techniques virologiques*, révisée et complétée par plusieurs techniques de la virologie moderne, saura répondre aux attentes de nos collègues.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier madame Patricia Jouvenne
pour son excellent travail de lecture
et de correction du manuscrit de cet ouvrage.

LISTE DES COLLABORATEURS

Institut Armand-Frappier
Université du Québec
531, boulevard des Prairies
Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Centre de recherche en virologie

Pierre Payment, Ph.D.

Michel Trudel, Ph.D.

Robert Alain, B.Sc.

Max Arella, Ph.D.

Serge Belloncik, Ph.D.

Laurent Berthiaume, Ph.D.

François Fossiez, M.Sc.

Claude Hamelin, Ph.D.

Michel Houde, M.Sc.

Patricia Jouvenne, M.Sc.

Jacqueline Lecomte, Ph.D.

Gilles Lussier, D.M.V., Ph.D.

Pierre Talbot, Ph.D.

J. Arnold Verbeek, M.Sc.

Centre de recherche en immunologie

André Fafard, M.Sc.

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de médecine
Université de Montréal
C.P. 6128, Station A
Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Simon Garzon, Ph.D.

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS vii

1. SÉCURITÉ AU LABORATOIRE
P. Payment et M. Trudel

1. INTRODUCTION 2
2. TYPES DE CONFINEMENT 2
   2.1. Bonnes techniques 2
   2.2. Équipement de biosécurité 3
   2.3. Installations 3
3. RÉFÉRENCES 3

2. CULTURE DE CELLULES EN FEUILLETS
P. Payment et M. Trudel

1. MILIEUX DE CULTURE 5
   1.1. Utilisation des antibiotiques 6
   1.2. Préparation, stérilisation et conservation 6
   1.3. Solutions dispersantes 8
      1.3.1. Trypsine-PBS 8
      1.3.2. Trypsine-citrate 9
      1.3.3. Trypsine-EDTA 9
      1.3.4. Versène 9
      1.3.5. Utilisation de ces solutions dispersantes 9
   1.4. Dispersion d'un feuillet cellulaire 10
   1.5. Préparation de cultures primaires 11
      1.5.1. Cultures primaires de reins de singe 11
      1.5.2. Cultures de fibroblastes aviaires (poulet, canard) 12
2. ENTRETIEN DES CULTURES 13
   2.1. Entretien des cultures primaires 13
   2.2. Entretien des cultures en lignées continues 13
   2.3. Entretien des cultures de cellules diploïdes 14
      2.3.1. Élaboration d'une culture cellulaire à partir de cellules congelées 14
      2.3.2. Multiplication des cellules diploïdes 15
   2.4. Comptage cellulaire 15
      2.4.1. Coloration au violet de cristal 15
      2.4.2. Coloration au Trypan bleu (épreuve d'exclusion du colorant) 16
3. CLONAGE 16
4. ÉPREUVE DE FORMATION DES COLONIES 17
5. CONGÉLATION ET DÉCONGÉLATION 18
   5.1. Congélation des cellules 18
   5.2. Décongélation et mise en culture 18
6. ÉTALEMENT DE CHROMOSOMES 18
7. RÉFÉRENCE 19

3. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES VIRUS
P. Payment et M. Trudel

1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS 21
   1.1. Selles 21
   1.2. Écouvillons et liquides biologiques 22
   1.3. Tissus 22
   1.4. Organes de souriceaux 22
2. INOCULATION À L'OEUF EMBRYONNÉ 22
   2.1. Voie amniotique 22
   2.2. Voie allantoïde 23
   2.3. Voie vitelline 23
   2.4. Voie intraveineuse 24
   2.5. Membrane chorio-allantoïde 24

3. ISOLEMENT SUR CULTURES CELLULAIRES 25
3.1. Choix 25
3.2. Isolement 25
3.2.1. Macrotechnique 25
3.2.2. Microtechnique 26
4. IDENTIFICATION DES VIRUS 27
4.1. Hémagglutination 27
4.1.1. Tampons 27
4.1.2. Préparation des hématies 28
4.1.3. Caractéristiques des hémagglutinines de quelques virus 28
4.1.4. Titrage d'un virus hémagglutinant 29
4.2. Hémadsorption 30
4.2.1. Mise en évidence 30
4.2.2. Inhibition de l'hémadsorption 31
4.3. Effets cytopathiques 31
4.3.1. Titrage de virus par effet cytopathique 35
4.3.2. Détermination du titre infectieux 35
4.3.2.1. Méthode de Reed-Muench 35
4.3.2.2. Méthode de Kärber 36
4.4. Titrage par plages 36
4.4.1. Entérovirus 36
4.4.2. Autres virus 38
4.5. Titrage par interférence 38
4.6. Épreuve de neutralisation de l'infectivité 39
4.7. Préparation de mélanges d'antisérums 40
4.8. Sensibilité à l'éther 42
4.9. Sensibilité au 5–IUDR 42
4.10. Microscopie électronique 43
4.11. Épreuve de température 43
4.12. Inoculation aux souriceaux nouveau-nés 43
5. RÉFÉRENCE 44

4. CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MODÈLES ANIMAUX
G. Lussier

1. INTRODUCTION 45
2. PRINCIPALES ESPÈCES 45
2.1. Souris 45
2.2. Rat 46
2.3. Cobaye 47
2.4. Hamster 47
3. FACTEURS INFLUENÇANT LE CHOIX ET L'UTILISATION 47
3.1. Facteurs reliés à l'hôte 47
3.1.1. Génotype 47
3.1.2. Âge 48
3.1.3. Sexe 48
3.1.4. Statut microbiologique 48
3.1.5. Environnement physique 50
3.2. Facteurs reliés à l'agent 50
3.2.1. Virulence 50
3.2.2. Dose 51
3.2.3. Voie d'inoculation 51
3.2.3.1. Voie intracérébrale 51
3.2.3.2. Voies périphériques 51
3.2.3.2.1. Voie respiratoire 51
3.2.3.2.2. Voie orale 52
3.2.3.2.3. Voie intraveineuse 52
3.2.3.2.4. Voie intrapéritonéale 52
3.2.3.2.5. Voies sous-cutanée et intradermique 52
3.2.3.2.6. Voie intra-utérine 53
4. SIGNES VISIBLES 53
4.1. Symptômes cliniques 53
4.2. Lésions 54
4.3. Épreuves sérologiques 54
4.4. Isolement viral 54
5. RÉFÉRENCES 54

5. TECHNIQUE D'INJECTION DES ANIMAUX
P.J. Talbot

1. INTRODUCTION 57
2. MATÉRIEL 57
2.1. Seringues 57
2.2. Aiguilles 57
3. MÉTHODES 58
3.1. Injection intrapéritonéale 58
3.2. Injection intraveineuse 58
3.3. Injection intracérébrale 59

6. CONCENTRATION DES VIRUS
P. Payment et M. Trudel

1. INTRODUCTION 61
2. MÉTHODES 61
   2.1. Hydroextraction 61
   2.2. Précipitation 62
      2.2.1. Précipitation au polyéthylène glycol 62
      2.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium 63
   2.3. Filtration moléculaire 63
      2.3.1. Cellules sous agitation 63
      2.3.2. En canal et tangentielle 63
      2.3.3. Fibres creuses 64
3. APPLICATIONS 64
4. RÉFÉRENCES 66

7. QUANTIFICATION DES PROTÉINES
P.J. Talbot

1. INTRODUCTION 67
2. TECHNIQUE SPECTRO-PHOTOMÉTRIQUE 67
3. TECHNIQUES COLORIMÉTRIQUES 68
   3.1. Test de Lowry 68
   3.2. Test de liaison du colorant 70
3. RÉFÉRENCES 72

8. PURIFICATION ET ANALYSE DES VIRUS PAR ULTRACENTRIFUGATION
M. Trudel et P. Payment

1. INTRODUCTION 73
2. CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE 73
3. CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITÉ 74
   3.1. Milieux de centrifugation 74
   3.2. Types de gradients 76
   3.3. Types de rotors 77
   3.4. Tubes et récolte des fractions de gradients 78
      3.4.1. Tubes Ultra-Clear™ 78
      3.4.2. Tubes en pollyallomère 78
      3.4.3. Tubes en polycarbonate 80
   3.5. Récolte des fractions 80
4. PARAMÈTRES IMPORTANTS 81
   4.1. Coefficient de sédimentation ($S_{20,w}$) 81
   4.2. Densité de flottaison 81
   4.3. Facteurs K et K' 81
   4.4. Quelques considérations sur l'échantillon 81
5. RÉFÉRENCES 88

9. CHROMATOGRAPHIE POUR L'ISOLEMENT DES VIRUS ET DES PROTÉINES VIRALES
M. Houde

1. INTRODUCTION 89
2. FILTRATION SUR GEL 89
3. CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'IONS 90
4. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ 90
5. PROTOCOLE 91
   5.1. Stratégie 91
   5.2. Préparation de l'inhibiteur 91
   5.3. Préparation de l'adsorbant 91
   5.4. Solubilisation des glycoprotéines 93
   5.5. Chromatographie 93
   5.6. Analyse des fractions 94
   5.7. Technique d'isolement de l'hémagglutinine 94
6. RÉSULTATS 94
   6.1. Isolement de la neuraminidase 94
   6.2. Isolement de l'hémagglutinine 94
7. CONCLUSIONS 94
8. RÉFÉRENCES 99

10. ÉLECTROPHORÈSE DE PROTÉINES VIRALES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE
M. Trudel et P. Payment

1. INTRODUCTION 101
2. MÉTHODE 101
   2.1. Préparation des gels 101
   2.2. Préparation des échantillons 103
   2.3. Électrophorèse 103

2.4. Coloration au bleu de Coomassie 104
2.5. Coloration à l'argent 104
3. DISCUSSION 105
4. RÉFÉRENCES 106

11. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
R. Alain, L. Berthiaume et M. Trudel

1. PRÉPARATION ET FIXATION DU SPÉCIMEN 107
1.1. Suspensions cellulaires et cultures de tissus 108
1.2. Tissus humains ou animaux .. 108
1.3. Fixation 108
1.3.1. Tétroxide d'osmium (OsO_4) 108
1.3.2. Permanganate de potassium 109
1.3.3. Fixateurs aldéhydiques 109
1.4. Déshydratation 109
2. MILIEUX D'ENROBAGE 110
2.1. Enrobage 110
2.1.1. Résines d'époxy 110
2.1.2. Vestopal W 110
2.1.3. Milieux d'enrobage solubles dans l'eau 110
2.1.4. Méthacrylates 111
2.2. Exemple d'enrobage: le Vestopal W 111
3. COUPES ULTRA-MINCES 111
3.1. Cryotomie 111
3.2. Coloration des coupes 112
3.2.1. Citrate de plomb 112
4. IMPRÉGNATION NÉGATIVE 112
4.1. Préparation directe sur grille 113
4.2. Congélation-décongélation 114
4.3. Osmolyse 114
4.4. Concentration sur gélose 115
4.5. Virus purifié 116
4.6. Micro-ultracentrifugation 116
5. RÉFÉRENCES 119

12. SÉROLOGIE
P. Payment et M. Trudel

1. MATÉRIEL POUR LES MICROTECHNIQUES 121
1.1. Plateaux 121
1.2. Pipettes calibrées 121
1.3. Microdiluteurs 121
1.4. Vérification des micro-pipettes 121
1.5. Supports à plateaux 122
2. INHIBITION DE L'HÉMADSORPTION 122
3. HÉMAGGLUTINATION 122
3.1. Préparation d'antigènes hémagglutinants 122
3.1.2. Liquides d'oeufs embryonnés 122
3.1.3. Cerveaux de souriceaux 123
3.1.4. Cultures cellulaires 123
3.1.4.1. Congélation - décongélation 123
3.1.4.2. Concentration des surnageants 123
3.1.4.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium 123
3.1.4.2.2. Précipitation au polyéthylène glycol (PEG–6000) 124
3.2. Traitements pour démasquer les hémagglutinines 124
3.2.1. Extraction alcaline 124
3.2.2. Traitement au Tween 80-Éther 124
3.3. Titrage des hémagglutinines . 124
4. INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION 125
4.1. Traitement des sérums 125
4.1.1. Kaolin acide 125
4.1.2. Héparine-chlorure de manganèse 125
4.1.3. Trypsine 125
4.1.4. RDE (Receptor Destroying Enzyme) 125
4.1.5. Acétone 126
4.1.6. Adsorption des agglutinines non spécifiques 126
4.2. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination 126
4.3. Applications de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination 127
4.3.1. Virus de la rubéole 127

4.3.2. Autres virus 129
5. SÉRONEUTRALISATION 131
5.1. Diagnostic sérologique d'une infection 131
5.1.1. Épreuve de sélection 132
5.1.2. Épreuve de neutralisation .. 132
6. SÉPARATION DES IMMUNOGLOBULINES EN GRADIENT DE DENSITÉ DE SACCHAROSE 133
6.1. Formation manuelle de gradients 134
6.2. Formation automatique de gradients 135
6.3. Interprétation des résultats 135
7. RÉFÉRENCE 135

13. IMMUNOFLUORESCENCE
J. Lecomte

1. INTRODUCTION 137
2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL . 138
2.1. Préparation et infection de cellules pour virus à croissance rapide 138
2.2. Préparation et infection de cellules pour un virus à croissance lente 139
2.3. Préparation de tissus 139
2.3.1. Cryotomie 139
2.3.2. Enrobage à la paraffine 140
2.4. Fixation des cellules ou tissus 140
3. MÉTHODE 140
3.1. Immunofluorescence directe . 140
3.2. Immunofluorescence indirecte 140
3.3. Élimination de la fluorescence non spécifique 141
4. MICROSCOPIE 141
5. RÉFÉRENCES 142

14. IMMUNOPEROXYDASE
S. Belloncik

1. APPLICATION À LA MICRO-SCOPIE PHOTONIQUE 144
1.1. Fixation 144
1.1.1. Frottis et feuillet cellulaires 144
1.1.2. Cultures de cellules en cabarets 144
1.1.3. Coupes de tissus 144
1.2. Immunoperoxydase directe ... 145
1.3. Immunoperoxydase indirecte 145
2. PEROXYDASE ANTI-PEROXYDASE (PAP) 146
3. COMPLEXE AVIDINE-BIOTINE (ABC) 146
4. RÉFÉRENCES 148

15. ELISA
P.J. Talbot

1. INTRODUCTION 149
2. MESURE DES ANTICORPS 150
2.1. Préparation des antigènes viraux 150
2.2. Méthode indirecte 150
2.3. Méthode indirecte en sandwich 152
2.4. Expression des titres ELISA .. 152
3. RÉFÉRENCES 153

16. IDENTIFICATION DES SITES ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX
P.J. Talbot

1. INTRODUCTION 155
2. TEST DE COMPÉTITION 155
2.1. Couplage de la peroxydase à l'anticorps 156
2. 2. Couplage de la biotine à l'anticorps 157
2. 3. Test de compétition 157
3. SÉLECTION DE VARIANTS ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX 158
4. RÉFÉRENCES 160

17. HISTOLOGIE ET HISTOCHIMIE
G. Lussier

1. INTRODUCTION 163
2. FIXATION DES TISSUS 164
2.1. Généralités 164

2.2. Formaldéhyde ou formol 164
2.3. Mélange de Bouin 164
2.4. Carnoy 164
2.5. Susa de Heidenhain 165
2.6. Fixateurs commerciaux 165
3. IMPRÉGNATION 165
3.1. La déshydratation 165
3.2. Éclaircissement 165
3.3. Imprégnation 165
4. ENROBAGE 166
5. CRYOTOMIE 166
6. COLORATION DES COUPES 166
6.1. Étapes préparatoires 166
6.2. Coloration proprement dite...166
6.3. Coloration de routine à l'hématoxyline-éosine 166
6.4. Mise en évidence des glucides (méthode à l'acide periodique-Schiff) 167
6.5. Mise en évidence des lipides (méthode à l'huile rouge O)..170
6.6. Mise en évidence des acides nucléiques 171
6.6.1. Méthode de Feulgen et Rossbeck 171
6.6.2. Méthode à l'acridine orange 172
6.7. Mise en évidence des microorganismes 172
6.7.1. Mise en évidence des bactéries par la méthode de Gram selon Brown et Brenn 172
6.7.2. Mise en évidence des mycobactéries par la méthode de Ziehl-Neelsen 173
6.7.3. Mise en évidence des champignons par la méthode de Grocott 174
6.7.4. Mise en évidence des inclusions virales par la méthode à la phloxine-tartrazine de Lendrum 175
7. COLORATION DE CELLULES SUR LAMES ET LAMELLES 176
7.1. Coloration à l'hématoxyline-éosine 176
7.2. Coloration au May-Gruënwald-Giemsa 176
8. CYTOLOGIE EXFOLIATRICE 177
8.1. Prélèvement des spécimens...177
8.2. Préparation des frottis 177
8.3. La fixation 177
8.4. Coloration des frottis cytologiques 178
8.4.1. Méthode de Papanicolaou 178
9. MONTAGE 179
10. RÉFÉRENCES 179

18. L'OR COLLOÏDAL COMME MARQUEUR EN VIROLOGIE
S. Garzon

1. PRÉPARATION DE SUSPENSIONS D'OR COLLOÏDAL MONODISPERSÉ..182
1.1. Méthode au thiocyanate de sodium ou de potassium (NaSCN ou KSCN) 183
1.2. Méthode au sodium borohydride 183
1.3. Réduction par le phosphore ..183
1.3.1. Particules de 3 nm 183
1.3.2. Particules de 5 nm 184
1.4. Méthode aux ultrasons 184
1.5. Réduction par l'acide ascorbique 184
1.6. Méthode à l'acide tannique....184
1.7. Réduction par le citrate de sodium 185
1.7.1. Particules d'or de 15 nm....185
1.7.2. Particules d'or de 40 nm....185
1.7.3. Particules d'or de 8 nm 185
2. PRÉPARATION DE COMPLEXES MARQUÉS 185
2.1. Détermination des conditions optimales de couplage 186
2.1.1. Détermination de la stabilité de l'or en fonction du pH ...186
2.1.2. Détermination des conditions optimales de pH 186

2.1.3. Détermination de la concentration minimale de protéine pour stabiliser l'or colloïdal 186
2.2. Méthodes de couplage des macromolécules à l'or colloïdal 187
2.2.1. Principe général 187
2.2.2. Immunoglobulines-Or 188
2.2.2.1. Préparation des immunoglobulines pour l'adsorption 188
2.2.2.2. Détermination de la concentration minimale stabilisante de protéine 188
2.2.2.3. Préparation du complexe IgG–or 188
2.2.2.4. Anticorps monoclonaux–or. 189
2.2.3. Protéine A-or 189
2.2.4. Protéine–G–or 190
2.2.5. Enzymes-or 190
2.2.6. Lectine-or 190
2.2.7. Streptavidine–or 191
3. APPLICATION À LA LOCALISATION DES PROTÉINES ET DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX 196
3.1. Application de l'or colloïdal aux méthodes d'immuno-empreinte 197
3.2. Application de l'or colloïdal en microscopie optique 197
3.2.1. Marquage des cellules avant fixation 198
3.2.2. Localisation sur coupes 198
3.3. Coloration de décoration immunonégative en microscopie électronique 199
3.3.1. Immunomarquage des virus directement sur grille 199
3.3.1.1. Exemple: Immuno-marquage du virus influenza B humain 200
3.3.1.2. Exemple: Immuno-marquage de cellules cultivées directement sur grille 200
3.3.2. Immunomarquage des virus en suspension 201
3.4. Localisation par la méthode de pré-enrobage 202
3.5. Localisation par la méthode de postenrobage 203
3.5.1. Préparation des spécimens 203
3.5.1.1. Fixation 203
3.5.1.2. Enrobage 204
3.5.2. Méthode d'immuno-or colloïdal 204
3.5.2.1. Modèle de fixation 204
3.5.2.2. Immunomarquage 205
3.5.2.3. Enzyme-or 206
3.5.2.4. Lectine-or 206
3.5.2.5. Streptavidine-or 206
3.5.2.6. Hybridation *in situ* 207
3.5.2.6.1. Hybridation *in situ* en microscopie optique 207
3.5.2.6.2. Hybridation *in situ* en microscopie électronique pour les ARN 209
4. CONCLUSION 209
5. RÉFÉRENCES 210

19. RADIO-MARQUAGE MÉTABOLIQUE ET CHIMIQUE
A. Fafard

1. INTRODUCTION 213
2. ACIDES NUCLÉIQUES 215
2.1. Marquage *in vivo* 216
2.2. Transcription acellulaire *in vitro* 216
2.3. Marquage enzymatique *in vitro* 216
2.3.1. Synthèse d'ARNc 216
2.3.2. Synthèse d'ADNc par la transcriptase inverse 217

2.3.3. Synthèse d'ADN par mécanisme de réparation ("Nick translation" ou coupure-substitution) 218
2.3.4. Système multiprime 219
2.3.5. Synthèse de sondes d'ADN sur matrices synthétiques ..219
2.3.6. Synthèse de sondes d'ADN avec le système M13 220
2.3.7. Marquages terminaux 221
2.3.7.1. T4 polynucléotide kinase 221
2.3.7.2. Terminale transférase ...222
2.3.7.3. Fragment de Klenow 223
2.3.7.4. ADN polymérase de T4 223
2.3.7.5. ARN ligase de T4 224
2.4. Radio-marquage chimique 225
2.4.1. Radio-iodation directe 225
2.4.2. Radio-iodation indirecte 226
3. PROTÉINES 227
3.1. Marquage *in vivo* 229
3.2. Traduction *in vitro* 229
3.3. Marquage enzymatique *in vitro* 231
3.3.1. Lactoperoxidase 231
3.3.2. Les Enzymobeads ™ (Bio–Rad) 232
3.4. Radio-marquage chimique 232
3.4.1. Radio-iodation directe 232
3.4.1.1. Monochlorure d'iode 232
3.4.1.2. Chloramine-T 233
3.4.1.3. Iodobeads ™(Pierce).....233
3.4.1.4. Iodo–Gen™ 234
3.4.2. Radio-marquage indirect ...234
3.4.2.1. Réactif de Bolton–Hunter 234
3.4.2.2. Réactif de Wood 235
3.4.2.3. Acide diiodosulfanilique diazoté 236
3.4.2.4. Acide N–hydroxy-succinimidyl-4–azido-salicilique (ANHS–AS).236
3.4.3. Marquage au tritium 237
3.4.4. Marquage avec les radionucléides métalliques 237
4. POLYSACCHARIDES 238
5. LIPIDES 239
6. RÉFÉRENCES 239

20. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOPRÉCIPITATION
M. Trudel et P. Payment

1. INTRODUCTION 241
2. MÉTHODE 241
3. DISCUSSION 244
4. RÉFÉRENCES 248

21. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOEMPREINTE
M. Trudel et P. Payment

1. INTRODUCTION 249
2. MÉTHODE 249
2.1. Transfert électrophorétique ...250
2.2. Immunoempreinte 251
3. DISCUSSION 251
4. RÉFÉRENCES 255

22. CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE
M. Trudel et P. Payment

1. INTRODUCTION 257
2. SÉPARATION DES PROTÉINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE 257
3. CLIVAGE CHIMIQUE 258
3.1. Bromure de cyanogène (CNBr) 258
3.2. N–chlorosuccinimide (NCS)..258
3.3. Clivage enzymatique 259
4. DISCUSSION 259
5. RÉFÉRENCES 263

23. ÉLECTROPHORÈSE DE MOLÉCULES D'ADN EN GEL D'AGAROSE
C. Hamelin

1. ÉLECTROPHORÈSE 265
1.1. Appareil à électrophorèse 265
1.2. Gels d'agarose en plaque 266
1.3. Discussion 266

2. GÉNOTYPAGE 272
2.1. Infection des cellules 272
2.2. Préparation de l'ADN 272
2.3. Clivage et électrophorèse 273
2.4. Résultats 273
3. DISCUSSION 273
4. RÉFÉRENCES 278

24. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX
P. Jouvenne et F. Fossiez

1. INTRODUCTION 279
2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX 279
2.1. Extraction des génomes à partir de virus purifiés 279
2.2. Extraction des ARNm viraux 281
2.2.1. Extraction des ARN cellulaires et viraux 282
2.2.2. Sélection des ARN poly(A)+ sur colonne de cellulose-oligo(dT) 282
2.2.3. Discussion 283
2.3. Extraction des plasmides recombinants par lyse alcaline 283
2.3.1. Extraction plasmidique à partir d'un petit volume de culture 284
2.3.2. Extraction plasmidique à partir d'un grand volume de culture: amplification des plasmides 285
2.3.3. Discussion 286
3. RÉFÉRENCES 286

25. TRADUCTION *IN VITRO*
P. Jouvenne

1. INTRODUCTION 289
2. SYSTÈMES DE TRADUCTION *IN VITRO* 289
2.1. Lysat de réticulocytes 289
2.2. Ovocytes d'amphibien 291
3. CONCLUSION 292
4. RÉFÉRENCES 292

26. CLONAGE DES GÈNES DE VIRUS À ADN
C. Simard

1. INTRODUCTION 295
1.1. Fragmentation de l'ADN à cloner 295
1.1.1. Méthode des digestions totales 295
1.1.2. Méthode des digestions partielles 296
1.2. Choix du vecteur de clonage . 296
1.2.1. Les vecteurs lambda et les cosmides 296
1.2.2. Les vecteurs plasmidiques . 297
2. MÉTHODE 297
2.1. Isolement de l'ADN viral 298
2.1.1. Concentration des virions .. 298
2.1.2. Purification de l'ADN viral 298
2.2. Digestion partielle de l'ADN génomique 299
2.3. Linéarisation du vecteur 301
2.4. Remplissage partiel des bouts cohésifs 301
2.5. Ligatures 302
2.5.1. Ligatures témoins 302
2.5.2. Ligature de l'ADN viral avec le vecteur 303
2.6. Transformation de *E. coli* 303
2.6.1. Préparation des cellules compétentes 304
2.6.2. Transformation proprement dite 304
2.6.3. Étalement des cellules transformées 305
2.6.3.1. Détermination de la viabilité cellulaire 305
2.6.3.2. Détermination de l'efficacité de transformation 305
2.6.3.3. Étalement des transformants et détermination du bruit de fond 305
3. RÉFÉRENCES 307

27. SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE
J.A. Verbeek et M. Arella

1. INTRODUCTION 309
2. SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE À PARTIR DE MOLÉCULES D'ARN MONOCATÉNAIRE 310
   2.1. Synthèse du premier brin: utilisation d'amorces d'oligo(dT) 310
   2.2. Synthèse du premier brin: amorces synthétiques, d'oligo(dT) ou d'ADN de thymus de veau 311
   2.3. Synthèse du second brin 312
   2.4. Digestion avec la nucléase S1 314
   2.5. Synthèse du second brin: utilisation de l'ARN-ase H 315
3. DISCUSSION 315
4. RÉFÉRENCES 317

28. SÉQUENÇAGE DES GÈNES VIRAUX
F. Fossiez

1. SÉQUENÇAGE PLASMIDIQUE . 319
2. MÉTHODE 320
3. RÉFÉRENCES 324

29. ÉTALEMENT DES ACIDES NUCLÉIQUES ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE
R. Alain

1. INTRODUCTION 325
2. MATÉRIEL 327
   2.1. Acides nucléiques 327
   2.2. Verrerie 327
   2.3. Solutions 327
   2.4. Grilles porte-objet 327
   2.5. Cytochrome c 327
3. TECHNIQUES DE TRANSFERT . 328
   3.1. Film à base de protéine. 328
      3.1.1. Étalement sur une grande surface. 328
         3.1.1.1. ADN ou ARN bicaténaires 328
      3.1.1.2. ARN monocaténaire 329
      3.1.2. Étalement sur une goutte ... 330
      3.1.3. Méthode de diffusion 330
   3.2. Technique sans protéine 330
4. COLORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES 331
   4.1. Coloration des acides nucléiques à l'acétate d'uranyle 331
   4.2. Technique d'ombrage 331
5. DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE 333
6. RÉFÉRENCES 334

30. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE
M. Arella et J.A. Verbeek

1. INTRODUCTION 337
2. HYBRIDATION *IN SITU* DE COLONIES BACTÉRIENNES 337
   2.1. Méthode 338
      2.1.1. Fixation et dénaturation sur papier filtre 338
      2.1.2. **Fixation et dénaturation sur membrane de** nitrocellulose 338
3. HYBRIDATION DE TYPE "SOUTHERN" 339
   3.1. Fractionnement de l'ADN 339
   3.2. Préparations pour le transfert sur filtres 339
      3.2.1. Nitrocellulose 340
      3.2.2. Nylon 340
   3.3. Fragmentation et dénaturation de l'ADN 340
   3.4. Transfert et immobilisation de l'ADN 340
      3.4.1. Nitrocellulose 340
      3.4.2. Nylon 340
4. HYBRIDATION DE TYPE "NORTHERN" 341
   4.1. Fractionnement de l'ARN 341
      4.1.1. Gels de glyoxal 341
      4.1.2. Gels de formaldéhyde 342
      4.1.3. Gels d'hydroxyde de méthylmercure 342

4.2. Préparations pour les transferts sur filtres 342
4.2.1. Nitrocellulose 342
4.2.2. Nylon 342
4.3. Transfert et immobilisation de l'ARN 342
5. HYBRIDATION 343
5.1. Hybridation avec des sondes radioactives 343
5.1.1. Pré-hybridation 343
5.1.2. Hybridation 343
5.2. Hybridation avec des sondes d'oligonucléotides 344
5.2.1. Pré-hybridation 344
5.2.2. Hybridation 344
5.3. Hybridation avec des sondes d'ARN 345
5.3.1. Pré-hybridation 345
5.3.2. Hybridation 345
5.4. Sondes biotinylées 345
5.4.1. Pré-hybridation 345
5.4.2. Hybridation 345
6. DÉTECTION DE L'HYBRIDATION ET RÉUTILISATION DES FILTRES 346
7. DÉTECTION DE VIRUS PAR HYBRIDATION 346
7.1. Virus contenant un génome d'ARN ou d'ADN monocaténaire 346
7.2. Virus contenant un ARN ou un ADN bicaténaire 347
8. SOLUTIONS 347
9. CONCLUSION 347
10. RÉFÉRENCES 349

1

SÉCURITÉ AU LABORATOIRE

Pierre Payment et Michel Trudel

1. INTRODUCTION

La sécurité au laboratoire ne commence pas seulement lorsqu'il s'agit de manipuler un virus reconnu hautement infectieux pour l'homme. La règle d'or est que tous les échantillons pathologiques, le sang et le sérum (même normal), les cultures cellulaires, les virus, les produits chimiques et les produits radioactifs doivent être manipulés avec soin. La liste des virus pathogènes pour l'homme s'allonge de jour en jour et des virus apparemment inoffensifs deviennent meurtriers dans certaines conditions de laboratoire où leur concentration est artificiellement augmentée de plusieurs logarithmes. Le Conseil de recherches médicales du Canada a publié une liste assez complète des virus et du niveau de confinement requis pour leur manipulation (CRM, 1979). On peut consulter aussi le rapport *Laboratory safety for arbovirus and certain other viruses of vertebrates.* (1980). Plusieurs produits chimiques d'utilisation courante sont très toxiques ou reconnus cancérigènes (acides et alcalis concentrés, acrylamide, benzidine, bromure de cyanogène, diamino-benzidine, dodecyl sulfate de sodium, tétroxyde d'osmium, etc.). Enfin, l'accumulation de radiations, à la suite de l'utilisation mal contrôlée de l'iode ou du phosphore radioactif (I^{125}, I^{131}, P^{32}) peut entraîner des problèmes de santé. Nous référons le lecteur aux revues de Miller *et al.* (1986), Block (1983), Bretherick (1975) et Steere (1971). On ne saurait donc trop insister sur l'importance de vérifier le danger potentiel de tous les produits utilisés au laboratoire.

Le centre de recherche en virologie a émis des règles minimales concernant la sécurité au laboratoire (Tableau 1). Certaines de ces règles peuvent paraître exagérées ou simplistes, mais l'expérience a démontré que les accidents, parfois fatals, avaient généralement pour cause un relâchement des règles élémentaires de biosécurité.

Nous possédons les connaissances, les techniques et l'équipement nécessaire pour prévenir les infections de laboratoire. Nous devons cependant avoir la sagesse de les utiliser pour confiner les agents infectieux ou toxiques. D'ailleurs, le terme "confinement" a une signification toute particulière en virologie: il décrit l'ensemble des méthodes qui régissent la manipulation d'agents infectieux ou toxiques dans le laboratoire.

2. TYPES DE CONFINEMENT

On reconnaît deux types de confinements: le confinement primaire, soit la protection du personnel et l'environnement immédiat du laboratoire, tel que fourni par des méthodes microbiologiques adéquates, la vaccination du personnel lorsque disponible, et l'équipement de laboratoire approprié; le confinement secondaire réfère à la protection de l'environnement extérieur au laboratoire, tel que fourni par les bonnes pratiques opérationnelles et les installations appropriées. Les trois éléments d'un bon confinement regroupent donc: les bonnes techniques microbiologiques, l'équipement de biosécurité et les installations appropriées.

2.1. BONNES TECHNIQUES

L'élément le plus important du confinement est le **respect intégral des techniques aseptiques** développées en microbiologie. Chaque laboratoire devrait développer ou adopter un manuel d'opération microbiologique qui identifie les dangers potentiels et qui définit les procédures et techniques à utiliser pour la manipulation des différents agents et produits afin de minimiser les risques de contagion ou d'intoxications.

Une **bonne hygiène personnelle** est une étape essentielle dans l'élaboration d'une protection efficace. Le simple fait de se laver régulièrement les mains et de ne jamais les porter à la bouche ou aux yeux constitue une barrière efficace contre plusieurs infections. Le port du masque chirurgical permet aussi de réduire non seulement le risque d'auto-infection mais aussi la contamination du matériel utilisé.

Tout **liquide, infectieux ou non, doit être manipulé à l'aide de pipettes ou de distributeurs appropriés**: *il est strictement interdit de pipetter à la bouche, car cette pratique représente un risque élevé d'infection ou d'intoxication.* Il en va de même pour les fumeurs: *il est strictement défendu de fumer dans les laboratoires,* car en plus des dangers évidents, le simple fait de porter la main à la bouche augmente le risque d'infection. D'autre part, les accidents de travail devraient toujours être rapportés au supérieur immédiat et pris en note. Ces accidents ne se limitent pas seulement aux coupures, mais aussi éraflures, morsures, piqûres et éclaboussures (chimiques ou biologiques).

Les **surfaces de laboratoire doivent être décontaminées plusieurs fois par jour au cours d'un travail constant**. L'hypochlorite de sodium à 10-100 mg/L ou le Wescodyne à 2% sont efficaces contre la majorité des micro-organismes: il faut cependant se rappeler que pour être efficace, tout agent décontaminant doit pouvoir agir pendant un certain temps. Le phénol à 2% qui a pendant longtemps été utilisé pour la décontamination des surfaces est à déconseiller vu sa haute toxicité: ce produit est facilement absorbé par la peau et les muqueuses du système respiratoire et digestif.

Un **sarrau (blouse de laboratoire) est souvent la seule barrière entre nos vêtements et le matériel infectieux.** Le sarrau doit être porté, boutons attachés, pendant toute manipulation de micro-organismes, produits biologiques ou produits chimiques. Au moment des réunions, de la pause-café ou des repas, il doit être laissé au laboratoire. Lorsqu'il se produit un accident de laboratoire comportant l'émission d'aérosols, on doit changer de sarrau.

Autre point important, **la décontamination du matériel souillé**: les agents décontaminants dont l'efficacité est reconnue sont la chaleur et les halogènes (le

chlore et l'iode sont les plus utilisés à des concentrations de 10-100 mg/L). La décontamination par la chaleur à 121°C/ 103 kPa de pression, durant 30 minutes, n'est pas toujours complète: une décontamination d'une heure est recommandée.

2.2. ÉQUIPEMENT DE BIOSÉCURITÉ

L'équipement de biosécurité comprend les **hottes à débit laminaire** et les différents contenants hermétiques pour confiner les micro-organismes. La hotte à débit laminaire constitue l'équipement principal pour confiner les aérosols infectieux générés par la manipulation des liquides biologiques et autres. Trois types de hotte sont disponibles: deux types avec ouverture frontale et air circulé filtré (Classe I et II) qui offrent une protection au personnel et à l'environnement et un type (Classe III) complètement étanche, fournissant le plus haut degré de confinement. Dans le cas de manipulations de petites quantités de produits toxiques, la hotte chimique avec évacuation à l'extérieur est requise.

L'équipement de biosécurité comprend aussi les éléments pour la protection personnelle comme: les gants, sarraus, tabliers, robes chirurgicales, couvre-chaussures, respirateurs, masques faciaux, lunettes de sécurité, sacs hermétiques, etc.

2.3. INSTALLATIONS

Au Canada, les *Directives concernant la manipulation de molécules d'ADN produites par recombinaison et des cellules et virus animaux* (Conseil de recherches médicales du Canada, 1979), définissent les pratiques de laboratoires applicables ainsi que le confinement et les installations appropriées au travail microbiologique. On y définit six niveaux de confinement (A à F) correspondant au risque inhérent aux agents étudiés. Ces niveaux de confinement sont équivalents aux niveaux définis par le National Institute of Health des États-Unis (P1 à P4). Il est recommandé de consulter ces guides pour les correspondances exactes.

3. RÉFÉRENCES

– . 1980. Laboratory safety for arbovirus and certain other viruses of vertebrates. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 29: 1359-1381.

–. 1979. *Directives concernant la manipulation des molécules d'ADN produites par recombinaison et de cellules de virus animaux*, Conseil de Recherches médicales du Canada, Ottawa.

Block, S.S. 1983. *Desinfection, sterilization and preservation*, 3rd edition. Lea & Febiger, Philadelphia, Pa., 1053 pages.

Bretherick, L. 1975. *Handbook of reactive chemical hazards*. CRC Press, Cleveland, Ohio, 976 pages.

Miller, B.M., Gerschel, D.H.M., Richardson, J.H., Vesley, D., Songer, J.R., Housewright, R.D. et Barkley, W.E. 1986. *Laboratory safety: Principles and practices*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 372 pages.

Steere, N.V. 1971. *CRC Handbook of Laboratory Safety*. CRC Press, Boca Raton, Fa, 854 pages.

Tableau 1

Mesures de sécurité

1. Il est strictement interdit de fumer, boire ou manger ailleurs que dans les locaux réservés à ces fins. La nourriture sera déposée aux endroits désignés à cette fin, jamais dans les laboratoires.
2. Le port du sarrau est obligatoire pour tout le personnel ayant à manipuler des produits biologiques humains ou animaux et des produits chimiques: on doit boutonner son sarrau. On ne doit pas porter le sarrau au cours des réunions, à la pause-café ou aux repas. On ne doit pas sortir de l'édifice avec un sarrau souillé: s'en procurer un propre si l'on doit travailler dans un autre édifice. On doit faire laver son sarrau à toutes les semaines, ou plus souvent si nécessaire.
3. On recommande le port des gants chirurgicaux à usage unique pour toute manipulation d'échantillons humains ou animaux, tels que le sang, les tissus, les selles, etc.
4. On ne doit pas pipetter avec la bouche. On utilise une poire ou tout autre système convenable. Les poires devront être régulièrement renouvelées ou décontaminées par un moyen approprié.
5. On doit effectuer toute les manipulations d'échantillons humains ou animaux dans une hotte laminaire, les échantillons doivent être placés sur une surface adsorbante plastifiée et doivent être envoyés à la décontamination à la fin du travail. Toutes les manipulations de produits toxiques doivent être faites sous une hotte chimique.
6. On doit décontaminer les tables de travail après chaque utilisation et à la fin de la journée avec un agent désinfectant (une solution contenant au moins 10 mg/L de chlore libre ou 2% de Wescodyne ou de Proviodine).
7. On portera tout le matériel utilisé (verrerie ou matériel à jeter) à la décontamination avant qu'il soit lavé ou jeté. Le matériel à décontaminer doit être placé dans des sacs ou contenants sans fuite, fermés hermétiquement, avant de sortir du laboratoire.
8. On doit se laver les mains avec du savon après chaque manipulation et avant de quitter le laboratoire.
9. On doit effectuer toutes les manipulations de façon à réduire la formation et l'émission d'aérosols.
10. On doit éviter de souiller les cahiers de laboratoire et les feuilles de travail.
11. Il est interdit aux visiteurs non accompagnés d'entrer dans les laboratoires.

DANS LE CAS D'UN ACCIDENT DE TRAVAIL, ON DOIT:

A) Laver à l'eau toutes les coupures et se rapporter au responsable du laboratoire ou à son remplaçant.

B) Rincer à l'eau ou à l'eau physiologique toute contamination des yeux avec le matériel de laboratoire et se rapporter au responsable du laboratoire ou à son remplaçant.

C) Rapporter au responsable du laboratoire ou à son remplaçant tout autre accident tel que brûlures, morsures ou piqûres.

2

CULTURE DE CELLULES EN FEUILLETS

Pierre Payment et Michel Trudel

1. MILIEUX DE CULTURE

Chaque type cellulaire a des besoins nutritifs bien spécifiques qui sont déterminés non seulement par l'expérience des chercheurs, mais aussi par l'adaptation de la population cellulaire au milieu utilisé. Il y a donc presque autant de variations dans la composition et l'utilisation des milieux de culture qu'il y a de types de cellules en culture.

La majorité des milieux de culture sont des milieux synthétiques disponibles commercialement (GIBCO Laboratories Inc., Grand Island, N.Y.). On y ajoute de 0.5 à 10% de sérum de fœtus de veau (SFV) ou de sérum de veau (SV). Certains ajoutent en plus de 1 à 10% d'hydrolysat de lactalbumine. Ces milieux sont tamponnés par du bicarbonate, ce qui nous oblige à utiliser des étuves à CO_2 (atmosphère contenant 5% de CO_2 et 95% d'air) si les récipients de culture ne sont pas hermétiques. Les tampons organiques, tel que l'HEPES (acide hydoxy ethyl piperazine sulfonique), permettent de remédier aux problèmes inhérents à ces étuves, mais leur usage n'est pas généralisé, car plusieurs cellules et virus requièrent la présence de bicarbonate pour leur croissance.

Voici quelques milieux de culture couramment utilisés et leur utilisation. Il ne faut cependant pas oublier que chaque type cellulaire peut avoir des besoins bien particuliers: on a donc avantage à bien se renseigner avant d'en entreprendre la culture.

Milieu 199 (base saline de Earle): élaboration de la croissance des cultures primaires par l'ajout de 5% à 10% de sérum de fœtus de veau.

Milieu MEM (Minimal Essential Medium) (base saline de Earle): utilisé pour l'entretien et croissance des lignées cellulaires et parfois pour l'élaboration et le maintien des cultures primaires. On y ajoute 10% de sérum de fœtus veau pour la croissance et de 0.5 à 2% pour le maintien.

Milieu EBM (Eagle Basal Medium) (base saline de Earle): utilisé pour la multi-

plication et le maintien de lignées diploïdes ou continues, en y ajoutant de 0.5 à 10% de sérum de fœtus de veau.

NOTE: Tous ces milieux peuvent aussi être obtenus avec une base saline de Hank. Cette base diffère de celle de Earle principalement par sa concentration cinq fois plus faible en bicarbonate. Elle est donc moins bien tamponnée et est exposée à des changements plus rapides de pH.

1.1. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont utilisés en culture cellulaire pour réduire la contamination par les bactéries, les champignons et les mycoplasmes. Leur emploi ne doit pas servir à camoufler des mauvaises techniques de travail, mais à maintenir en bon état les cultures cellulaires. Certains types cellulaires, les cultures primaires et les lignées diploïdes en particulier, exigent l'utilisation d'antibiotiques, mais certains peuvent être toxiques à des concentrations trop élevées. Les concentrations recommandées ne devront donc pas être augmentées. Le tableau 1 indique les antibiotiques les plus utilisés et leur concentration finale dans le milieu de culture. On aura avantage à préparer des solutions 100X qui seront conservées à –20°C, en volumes de 5 mL. On utilisera une solution contenant un seul ou plusieurs de ces antibiotiques selon la protection requise et le spectre d'activité des antibiotiques.

1.2. PRÉPARATION, STÉRILISATION ET CONSERVATION

L'apparition sur le marché de milieux synthétiques en poudre a simplifié la préparation des milieux de culture. Ces milieux sont offerts en sachets contenant suffisamment de poudre pour préparer 5 ou 10 litres de milieu complet par la simple addition d'eau. La qualité de l'eau utilisée est sans doute la composante la plus importante: l'eau devrait être tri-distillée, mais en pratique, on utilise de l'eau bi-distillée-déminéralisée, ou purifiée dans des systèmes spéciaux (Millipore Corp., Bedford, Mass.). Il faudra ajouter du bicarbonate de sodium et ajuster à pH 7.2–7.4 avant de stériliser à froid sur des membranes filtrantes de 0.22 µm. Le milieu est réparti en bouteilles qui seront conservées à 4°C à l'abri de la lumière. Conserver les milieux préparés et vendus sous forme concentrée liquide (2X, 5X ou 10X) à 4°C, mais on y ajouter de la glutamine avant de les utiliser. Ces milieux sont très pratiques pour les laboratoires utilisant seulement de faibles quantités de milieux de culture: il suffit d'y ajouter de l'eau tri-distillée stérile.

Les quelques règles suivantes sont simples mais elles permettront d'éviter beaucoup de problèmes:

a) Conserver les solutions utilisées à la température optimale et donner la préférence aux solutions fraîches dans la préparation des cultures (Tableau 2).

b) Protéger de la lumière toutes les solutions et en particulier les milieux de culture: certaines ondes provoqueraient en quelques heures seulement la formation de composés toxiques pour les cellules.

c) S'assurer de la qualité chimique de l'eau utilisée.

d) Vérifier l'isotonicité du milieu.

e) Utiliser de préférence des solutions à 37°C sur les cellules.

Tableau 1

Antibiotiques utilisés en cultures cellulaires

Antibiotique	Micro-organismes susceptibles	Concentration
Pénicilline	Bactéries Gram +	100 U/mL
Streptomycine	Bactéries Gram –	100 µg/mL
Fungizone (Amphotéricine B)	Champignons et levures	2.5 µg/mL
Mycostatine	Champignons et levures	100 µg/mL
Kanamycine	Bactéries et mycoplasmes	100 µg/mL
Néomycine	Large spectre	50 µg/mL
Tylocine	Mycoplasmes	60 µg/mL
Auréomycine	Large spectre	50 µg/mL
Gentamycine	Large spectre	50 µg/mL

Tableau 2

Entreposage des solutions pour culture cellulaire

Solutions	Température	Durée	Autres conditions
Solutions salines	20°C	1 an	à l'abri de la lumière
Milieux de culture (liquides)			
– avec glutamine	4°C	2 mois[a]	à l'abri de la lumière
– sans glutamine	4°C	4-6 mois	à l'abri de la lumière
Milieux en poudre	4°C	1 an	à l'abri de la lumière
Sérum	–20°C	6 mois	
Sérum inactivé par la chaleur	4°C	6 mois	
Antibiotiques			
– lyophilisés	4°C	1 an	
– liquides (100X)	–20°C	6-12 mois	
Glutamine (100X, 200 mM)	–20°C	6 mois	
Trypsine	–20°C	2-3 mois	
	4°C	1 semaine	
Versène	20°C	1 an	
Hydrolysats de lactalbumine	4°C	2-3 mois	
Bicarbonate de sodium (7,5%)	20°C	1 an	bouteilles hermétiques

[a] Après 2 mois, il est préférable d'ajouter 2 mM de glutamine au milieu de culture (1 mL/100 mL d'une solution à 200 mM) avant de l'utiliser.

Tableau 3

Stérilisation des solutions

Autoclaver[a]	Filtrer[b]
Agar	Glucose (<10%)
Glycérol	Glutamine
HEPES	Collagénase
Hydrolysat de lactalbumine	Sérum
Rouge de phénol	Trypsine
EDTA	Vitamines
Eau	NaOH 1 N
Glucose (>10%)	HCl 1 N
	Acides aminés
	Antibiotiques
	Bicarbonate de sodium (7.5%)

[a] Autoclaver 20 min 15 lbs (103 kPa) à 121°C.

[b] Sur une membrane stérile de 0.2 µm.

1.3. SOLUTIONS DISPERSANTES

La **trypsine** peut être obtenue sous forme cristalline (Millipore Corporation ou Sigma Chemicals) ou liquide déjà préparée à 0.25% dans une solution saline isotonique tamponnée (GIBCO). Cet enzyme brise les liens protéiques intercellulaires et libère ainsi chaque cellule. Il est nécessaire d'arrêter l'action enzymatique de la trypsine sinon les cellules seront tuées. L'addition de milieu de culture contenant du sérum de fœtus de veau aux cellules dissociées, remplit cette fonction car ce sérum contient des inhibiteurs de la trypsine.

Le **versène** est une solution à 0.02% d'EDTA (ethylene diamino acetic acid) dans une solution saline isotonique tamponnée ne contenant aucun sel de calcium ou de magnésium. Cette substance, en agissant comme accepteur des ions bivalents ou trivalents, peut provoquer la dissociation des cellules. En effet, les liens qui retiennent les cellules entre elles ou à un substrat solide (verre ou plastique) sont dépendants de la présence de ces ions. Ici encore, il sera nécessaire de neutraliser l'EDTA par l'addition de milieu de culture contenant de grandes quantités d'ions inorganiques.

Le **pH des solutions dispersantes est important** car à un pH inférieur à 7, la trypsine est inactive et à un pH supérieur à 8, les cellules sont rapidement endommagées. Or, c'est en solution alcaline que la trypsine est la plus active. **La trypsine, pour être plus active, est donc préparée à pH 7.4 à 7.8.**

La **température des solutions dispersantes doit toujours être amenée à 37°C avant de les placer en contact avec les cellules.** La dispersion du feuillet doit être rapide sinon les cellules seront irrémédiablement endommagées. De plus, l'action des agents dispersants est optimale à cette température. Différentes solutions dispersantes sont utilisées dans nos laboratoires: trypsine-PBS, trypsine-citrate, trypsine-EDTA et versène. Elles sont stérilisées par filtration sur membrane 0.22 µm stérile.

1.3.1. Trypsine-PBS

Solutions

Trypsine (0.25%) dans de la saline phosphatée à pH 7.2–7.4

Préparation de la saline phosphatée (PBS: Phosphate Buffered Saline)

Solution A

NaCl ..... 8.00 g

KCl ..... 0.20 g

$Na_2HPO_4.2H_2O$ ..... 1.15 g

KH_2PO_4 ..... 0.20 g

H_2O ..... à 800 mL

Solution B

$CaCl_2$ ..... 0.100 g

ou $CaCl_2.2H_2O$ ..... 0.132 g

H_2O ..... à 100 mL

Solution C

$MgCl_2.6H_2O$ ..... 0.1 g

H_2O ..... à 100 mL

Dissoudre les sels dans l'ordre indiqué puis mélanger les solutions A et C. Ajouter lentement le mélange A-C à la solution B en agitant sans cesse. Stériliser par filtration sur membrane 0.22 µm stérile ou à l'autoclave: chaque solution sera traitée séparément pendant 10 min à 100°C, puis le mélange sera effectué de façon aseptique. Ajouter 0.25% de trypsine purifiée.

1.3.2. Trypsine-citrate

Trypsine (0.25%) dans un tampon citrate pH 7.8

Préparation du tampon citrate:

Citrate de sodium ..... 2.96 g

NaCl ..... 6.00 g

H_2O ..... 1.00 L

Ajuster à pH 7.8.

1.3.3. Trypsine-EDTA

Trypsine (0.05%) et EDTA-disodique (0.02%) dans du PBS, sans calcium ni magnésium.

Préparation du PBS sans calcium - magnésium

NaCl ..... 8.00 g/L

KCl ..... 0.20 g/L

Na_2HPO_4 ..... 1.15 g/L

KH_2PO_4 ..... 0.20 g/L

Glucose ..... 0.20 g/L

Le pH de cette solution est de 7.4.

1.3.4. Versène

EDTA disodique (0.02%) dans du PBS sans calcium ni magnésium.

1.3.5. Utilisation de ces solutions dispersantes

L'utilisation de ces différentes solutions a un caractère historique et reflète les besoins particuliers de certains chercheurs.

La **trypsine-PBS** est une solution d'utilité générale. Cependant, à pH 7.2-7.4, l'effet dispersant de la trypsine est plus lent. Certains types cellulaires sont très sensibles à une action prolongée de cet enzyme; plusieurs préfèrent donc utiliser le versène ou la trypsine-citrate.

La **trypsine-citrate** est aussi une solution d'utilité générale, mais dont le pH est plus approprié à l'action de la trypsine.

La **trypsine-EDTA** est utilisée dans certains laboratoires pour accélérer le processus de dispersion cellulaire.

Le **versène** est surtout utilisé lorsque l'action de la trypsine entraîne des pertes importantes de la viabilité cellulaire par son action protéolytique.

1.4. DISPERSION D'UN FEUILLET CELLULAIRE

1. Vidanger le milieu de culture.

2. Rincer le feuillet cellulaire avec 10 mL d'une solution saline ou de milieu de culture sans sérum préchauffé à 37°C (si la solution utilisée pour la dispersion contient de l'EDTA, rincer le feuillet cellulaire avec du PBS sans calcium ni magnésium ou de la saline).

   ou

   Rincer le feuillet avec quelques millilitres de la solution dispersante à 37°C. Il est préférable de déposer les solutions sur la face opposée au feuillet cellulaire puis de faire glisser lentement la solution sur le feuillet. Pour vidanger, procéder à l'inverse.

3. Ajouter 2 mL de la solution dispersante et la répartir sur le feuillet cellulaire.

4. Incuber 10-15 min à 37°C.

5. Recueillir les cellules en agitant doucement.

6. Les remettre en suspension dans le milieu de culture approprié contenant 10% de SFV (le SFV a une action anti-tryptique).

7. Après le comptage cellulaire, il faut diluer les cellules dans le milieu de croissance et les placer dans le récipient approprié.

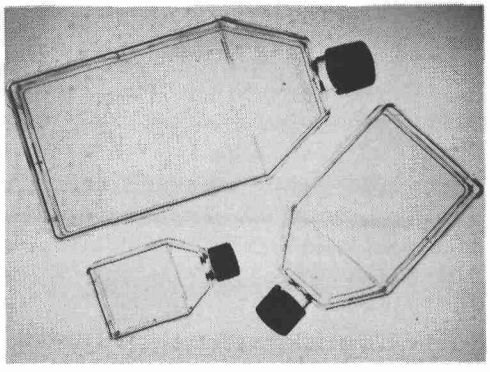


Figure 1

Flacons pour culture cellulaire

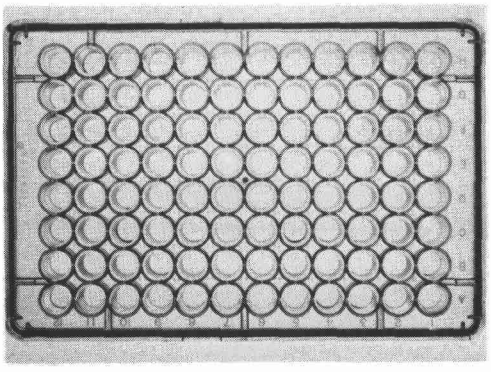


Figure 2

Microcabaret pour culture cellulaire

1.5. PRÉPARATION DE CULTURES PRIMAIRES

1.5.1. Cultures primaires de reins de singe

IMPORTANT: Les cultures primaires de cellules de reins ou d'autres organes de singe nécessitent un niveau de confinement de catégorie C en raison des micro-organismes pathogènes pour l'homme qu'elles peuvent contenir (normes du Conseil de recherches médicales du Canada). Toutes les manipulations devront donc être réalisées à ce niveau de confinement. S'il s'agit de reins provenant d'autres espèces animales, un niveau de confinement B sera adéquat.

Solutions requises

Tampon ou milieu préchauffé à 37°C pour le transport des reins après le prélèvement et pour le lavage des reins coupés avant la trypsination.

Trypsine-PBS préchauffée à 37°C pour disperser les cellules.

Milieu 199-Hank additionné de 2% de SFV inactivé et de pénicilline (100 U/ mL) streptomycine (100 µg/mL) pour l'initiation de la culture.

Milieu 199-Earle, 1% SFV, Pen-Strep pour le maintien des cellules.

Méthode

1. *Prélèvement des reins*: Anesthésier, saigner, raser et laver l'animal, prélever les reins dans une salle d'opération en dehors de l'animalerie. Désinfecter la peau avec une solution de Wescodyne avant d'inciser à l'aide d'instruments stérilisés. Flamber le tissu sous-cutané, inciser les muscles, prélever les reins et les placer dans un bocal stérilisé contenant du PBS. On doit pratiquer une autopsie sur les animaux qui seront examinés par un vétérinaire. Utiliser les reins provenant uniquement d'animaux ne montrant aucun signe de maladie infectieuse. On peut aussi améliorer le rendement cellulaire en perfusant les reins *in situ* avec la trypsine.
2. Transférer stérilement les reins dans un grand vase de Petri à l'aide d'une pince stérilisée (rejeter l'instrument).
3. Enlever la capsule, le tissu conjonctif et les caillots de sang à l'aide d'une pince et d'un scalpel stérilisés (rejeter les instruments).
4. Placer les reins dans un nouveau vase de Petri à l'aide d'une pince stérilisée.
5. *Culture cellulaire* : Couper les cortex en fragments de tissus d'environ 1 mm^3, rejeter la substance médullaire.
6. Transférer les fragments dans un erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de PBS préchauffé à 37°C.
7. Laver trois fois avec 150 mL de PBS préchauffé à 37°C.
8. Transférer les tissus dans un erlenmeyer de 500 mL contenant une barre magnétique.
9. Rincer trois fois avec 150 mL de trypsine-PBS préchauffée à 37°C.
10. Rejeter le dernier rinçage et ajouter 100 mL de trypsine-PBS préchauffée à 37°C aux fragments de tissus.

11. Agiter pendant 5 min à l'aide d'une agitateur magnétique dans une étuve à 37°C.

12. Rejeter ce premier surnageant.

13. Ajouter 150 mL de trypsine-PBS préchauffée à 37°C, puis replacer dans l'étuve pendant 30 min.

14. Récupérer le surnageant de chaque trypsination dans une bouteille à centrifugation contenant 10 mL de SFV et centrifuger à 100 x *g* pendant 20 min.

15. Vidanger le surnageant dans un récipient stérilisé et récupérer le culot.

16. Préparer 500 mL de milieu 199-Hank, contenant 2% SFV, 100 U/ mL de pénicilline et 100 µg/ mL streptomycine, préchauffés à 37°C. Réserver 300 mL dans un erlenmeyer de 500 mL, et le reste (10 à 20 mL par fraction) serviront à récupérer et rincer les cellules en culot, et iront rejoindre les 300 mL en attente.

17. Répéter les opérations 15 et 16 jusqu'à ce que le tissu soit complètement épuisé.

18. Faire un comptage cellulaire au bleu de Trypan en considérant le volume final des fractions de trypsination. Maintenir les cellules en suspension avec un agitateur magnétique.

19. Préparer une suspension à 175 000 cellules/mL et placer dans les récipients appropriés.

1.5.2. Cultures de fibroblastes aviaires (poulet, canard)

1. Prélever stérilement les embryons des oeufs (poussin de 10-14 jours, canard de 13-14 jours).

2. Enlever la tête, les ailes et les pattes.

3. Couper en petits morceaux le reste du corps.

4. Rincer trois fois avec du tampon PBS (voir 1.5.1).

5. Rincer une fois avec de la trypsine-PBS.

6. Faire deux trypsinations de 30 min avec de la trypsine-PBS, à la température de la pièce.

7. Centrifuger pendant 15 min à 800 x *g*.

8. Suspendre les cellules dans du milieu MEM-Hank 6% SFV avec Pen-Strep.

9. Faire un comptage cellulaire au bleu de Trypan.

10. Ajuster la suspension à 800 000 cellules/mL dans du milieu MEM-Hank 6% SFV avec Pen-Strep.

11. Répartir dans les récipients appropriés et incuber à 37°C.

12. À la confluence, changer le milieu pour un mélange 1:4 de milieux MEM-Hank: MEM-Earle additionné de 0.5% SFV et de Pen-Strep.

2. ENTRETIEN DES CULTURES

2.1. ENTRETIEN DES CULTURES PRIMAIRES

Les cultures primaires ne peuvent être maintenues longtemps, contrairement aux cellules en lignées. Elles sont donc utilisées directement pour la production ou l'isolement de virus, quoi qu'il soit aussi possible de les utiliser au deuxième ou troisième passage. Dans ce cas, la sensibilité de ces cellules à certains virus est cependant réduite. Cette option permet cependant la congélation des cellules au premier passage et leur utilisation au besoin.

Un mélange en parties égales de milieu MEM-Hank et de milieu MEM-Earle additionné de 0.5–2% de SFV permettra de maintenir la plupart des cultures primaires. Certains types cellulaires requièrent des milieux de culture différents et il faudra se renseigner sur les besoins de ces cellules.

2.2. ENTRETIEN DES CULTURES EN LIGNÉES CONTINUES

Contrairement aux cellules en culture primaire ou aux cellules diploïdes, les cellules en lignées continues peuvent être sous-cultivées des centaines de fois. Au cours de ces nombreuses générations, les caractères originaux des cellules seront perdus peu à peu et le nombre de chromosomes deviendra hétéroploïde. Ces cellules ont un taux de multiplication beaucoup plus élevé que les autres types, et il est possible de faire des dilutions des sous-cultures de 1:5 à 1:20.

Les passages seront faits par trypsination du feuillet cellulaire, puis par dilution dans un milieu de croissance.

Méthode

1. Vidanger le milieu de culture.
2. Rincer la culture avec 5-10 mL de solution dispersante à 37°C.
3. Incuber à 37°C en présence de 1-2 mL de solution dispersante.
4. Lorsque le feuillet est détaché, ajouter 5-10 mL de milieu de croissance et disperser les cellules à l'aide d'une pipette munie d'une poire.
5. Faire un comptage après coloration au Bleu de Trypan.
6. Diluer la suspension cellulaire dans le milieu de croissance et répartir dans les récipients de culture. La dilution à effectuer pour chaque type cellulaire est déterminée par l'expérience; généralement, une dilution de 1:3 à 1:5 est effectuée.
7. Incuber à 37°C.
8. Changer le milieu de culture pour un milieu de maintien (milieu additionné de 2% de SFV), lorsque le feuillet est confluent, .
9. Il est possible de conserver les cellules dans le milieu de maintien plusieurs semaines en changeant ce milieu une ou deux fois par semaine. Il est aussi possible de ralentir le métabolisme et la croissance des cellules en incubant les cultures à 33 ou 35°C.

Il est avantageux de maintenir une ou deux bouteilles d'un type cellulaire donné. Ces cellules seront sous-cultivées à tous les 7-10 jours. Si l'utilisation d'un type cellulaire est occasionnelle, il est

alors préférable de préparer une banque cellulaire congelée.

Volume de solution selon le type de récipients:

Surface	*25 cm²*	*75 cm²*	*150 cm²*
Rinçage	5 mL	5 mL	10 mL
Trypsine	2 mL	3 mL	5 mL
Milieu	10 mL	45 mL	100 mL

2.3. ENTRETIEN DES CULTURES DE CELLULES DIPLOÏDES

Les cultures diploïdes possèdent encore la plupart des caractères originaux de l'organe d'origine. Ces cellules peuvent être cultivées jusqu'à environ 50 générations, puis elles vieillissent, cessent de se diviser et meurent.

Leur culture exige des précautions beaucoup plus grandes que la culture des cellules hétéroploïdes ou même des cultures primaires. Les précautions suivantes sont **vitales pour le maintien des cellules diploïdes de poumon humain (WI-38 par** exemple).

- Utilisation du milieu EBM-D (Eagle Basal Medium-Diploïd) (base de Earle) contenant 50 µg/mL d'auréomycine). *(Reconstituer 500 mg d'auréomycine avec 50 mL d'eau distillée à 37°C, puis répartir en volumes de 5 mL et congeler à -20°C. Ajouter 5 mL/500 mL de milieu de culture).*

- Toutes les solutions qui entrent en contact avec les cellules doivent être chauffées à 37°C.

- Toutes les solutions seront ajustées à pH 7.2 et ne devront jamais dépasser pH 7.4 même après incubation à 37°C.

- On ne doit jamais déposer les récipients de culture contenant les cellules sur des surfaces froides (tables en acier ou autres). Utiliser une surface de protection, telle que du Styrofoam ou du carton ondulé.

- Effectuer régulièrement la multiplication des cellules: une fois par semaine, dilution 1:2, confluence en 3 à 4 jours (1 génération).

2.3.1. Élaboration d'une culture cellulaire à partir de cellules congelées

1. Ampoule contenant 2 x 10^6 cellules dans 1 mL de milieu EBM-D avec 10% de SFV, 10% de glycérol et de l'auréomycine.

2. Préchauffer à 37°C 20 mL de milieu additionné de 10% de SFV et d'auréomycine.

3. Placer l'ampoule pendant 2 min dans **un bain-marie à 37°C**.

4. Prélever le contenu de l'ampoule à l'aide d'une pipette Pasteur stérilisée, dissocier les cellules et compléter à 20 mL avec le milieu préchauffé.

5. Placer cette suspension cellulaire dans un flacon de 75 cm² non fermé hermétiquement. Incuber à 37°C dans une étuve à CO_2 (5% CO_2).

6. Après 24 h, fermer le bouchon hermétiquement après avoir changé le milieu pour 20 mL de milieu neuf.

7. Placer à 37°C pendant 6 jours.

8. Effectuer des multiplications régulières.

2.3.2. Multiplication des cellules diploïdes

1. Vidanger le milieu et ajouter 5 mL de trypsine-PBS sur la paroi opposée aux cellules puis retourner le flacon lentement pour baigner les cellules.

2. Après 1-2 min, vidanger la trypsine par le côté opposé aux cellules, ajouter 2 mL de trypsine-PBS et placer le flacon à 37°C pendant 10–20 min.

3. Ajouter 5 mL de milieu à 37°C, puis dissocier les cellules à l'aide d'une pipette. Compléter avec 35 mL de milieu et répartir dans deux bouteilles. Incuber à 37°C.

Il est très important:

- de préchauffer toutes les solutions à 37°C
- de ne jamais placer les bouteilles sur une surface froide
- de ne jamais les laisser à la température de la pièce
- de bien dissocier les cellules
- de multiplier par 2 ou par 4 et inverser à chaque multiplication afin de ne pas épuiser les cellules
- de toujours utiliser de la trypsine-PBS et du milieu EBM-D

Il est aussi très important de noter le nombre de passages puisque ces cellules cesseront de se multiplier après 50 passages environ. À chaque dilution 1:2 le nombre de passages (générations) augmente de 1 (on incube la culture pendant 3 à 4 jours). Lors d'une dilution 1:4 le nombre de passages augmente de 2 (on incube alors la culture de 5 à 7 jours). En plus de déterminer le nombre de passages, il est utile de déterminer le taux de multiplication de cellules diploïdes. En effet, ce taux sera différent au cours des derniers passages.

2.4. COMPTAGE CELLULAIRE

2.4.1. Coloration au violet de cristal

Le cristal violet colore en bleu les noyaux des cellules et permet d'en faire le comptage, y compris celles en agrégat.

Solution

Cristal violet ..... 1.0 g

Acide citrique ..... 19.2 g

Eau déminéralisée ..... 1.0 L

Dissoudre l'acide citrique dans l'eau puis ajouter le cristal violet.

Cette solution se conserve à la température de la pièce.

Méthode

1. Ajouter 0.5 mL de la solution colorante, à 0.5 mL de la suspension cellulaire à compter.

2. Bien mélanger avec une pipette Pasteur afin de briser les agrégats de cellules.

3. Placer une goutte dans chaque chambre d'un hématiemètre Neubauer.

4. Compter le nombre de cellules dans 25 petits carrés du centre de chaque chambre. Il devrait y avoir environ 100 cellules par chambre. S'il y en a beaucoup plus, on peut compter seulement 5 chambres au hasard et multiplier par 5 la valeur obtenue, ou encore diluer 1:2 ou 1:5 la suspension

cellulaire et multiplier par 2 ou 5 selon le cas. Additionner les deux valeurs.

5. Le nombre de cellules/mL est obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$\text{Cellules/mL} = \frac{\text{cellules comptées}}{2} \times 10\ 000 \times 2$$

où 10 000 est la constante de la chambre de comptage. Ce facteur ramène le nombre de cellules comptées à un volume de 1 mL. Les cellules comptées dans chaque chambre sont contenues dans un volume de 1 mm x 1 mm x 0.1 mm, soit 1/10 000 de cm^3 (1 cm^3 = 1 mL).

Diviser le nombre de cellules comptées par 2 pour obtenir une moyenne. Multiplier cette moyenne par 2 dans le but de compenser pour la dilution faite à l'étape 1. Ces deux valeurs s'annulent (dans ce cas particulier) et la formule devient:

Cellules/mL =
cellules dans 2 chambres x 10 000

2.4.2. Coloration au Trypan bleu (épreuve d'exclusion du colorant)

Le Trypan bleu est un colorant vital qui ne pénètre que dans les cellules mortes dont la membrane ne peut plus l'exclure.

Solution

Trypan bleu ..... 1 g

PBS ..... 100 mL

Méthode

1. Ajouter 0.1 mL de la solution colorante à 0.4 mL de la suspension cellulaire à compter.
2. Bien mélanger la suspension avec une pipette Pasteur.
3. Déposer une goutte dans chacune des chambres d'un hématiemètre Neubauer.
4. Compter le nombre de cellules totales dans la section centrale (25 carrés), ou encore dans cinq sous-sections de chaque chambre choisies au hasard et multiplier par 5 la valeur obtenue. Les cellules mortes sont colorées en bleu. Les cellules vivantes sont incolores. Il est préférable de compter le contenu de 2 chambres et d'en faire la moyenne.
5. Le nombre de cellules vivantes/mL est évalué par la formule suivante:

Cellules incolores dans 25 carrés x 10 000 x 5/4

On multiplie par 10 000 pour obtenir la valeur par millilitre, le volume évalué étant de 0.1 mm^3 (1 mm x 1 mm x 0.1 mm) soit 5 carrés x 5 carrés multiplié par l'espace entre lame et lamelle (0.1 mm). Enfin, on multiplie par 5/4 pour compenser la dilution provoquée par l'addition du colorant à l'étape 1.

3. CLONAGE

Les cultures obtenues à partir d'explants et de certaines lignées cellulaires sont un mélange de types cellulaires. Il est parfois utile d'obtenir des cellules issues d'une seule cellule et possédant, de ce fait, les caractères de celle-ci. Le processus de sélection est le clonage et la lignée obtenue est appelée "clone".

1. Préparer une suspension monocellulaire à partir de la lignée cellulaire à étudier.

2. Diluer à 20 cellules/mL dans le milieu approprié contenant 10% de SFV.

3. Déposer 50 µL de cette suspension dans chacune des cupules d'un plateau à 96 cupules à fond plat.

4. Ajouter 100 µL de milieu de croissance à chaque cupule.

5. Replacer le couvercle et incuber 3 h à 37°C dans une étuve à CO_2 humidifiée.

6. Examiner chaque cupule au microscope. Marquer celles qui contiennent une seule cellule.

7. Replacer à 37°C.

8. Examiner à chaque jour et noter le taux de croissance et la morphologie cellulaire.

9. Changer le milieu tous les 3 ou 4 jours ou plus souvent si nécessaire.

10. Vidanger le milieu de culture dans les cas où les cellules ont formé un feuillet et ajouter 100 µL de trypsine-PBS par cupule.

11. Recueillir les cellules qui se détachent avec une pipette Pasteur et les placer dans une cupule d'un plateau à 12 ou 24 cupules.

12. Ajouter du milieu de croissance et incuber à 37°C.

13. Lorsque le feuillet est confluent, trypsiner les cellules et les transférer dans un flacon de 25 cm^2. À la confluence, passer à un flacon de 75 cm^2 et ainsi de suite.

4. ÉPREUVE DE FORMATION DES COLONIES

Cette épreuve a pour but de déterminer quelle fraction d'une suspension cellulaire peut se développer et être ainsi à l'origine d'une nouvelle colonie. En effet, toutes les cellules ne possèdent pas ce potentiel et une simple épreuve d'exclusion du colorant n'est jamais concluante pour déterminer la viabilité des cellules.

1. Préparer une suspension monocellulaire de 500 à 2000 cellules/mL dans le milieu approprié contenant 10% de SFV.

2. Placer 1 mL de cette suspension dans une boîte de Petri de 60 mm dont le fond est quadrillé (assurez-vous qu'il s'agit bien d'un récipient pour culture de tissus).

3. Ajouter 4 mL de milieu contenant 10% de SFV. Mélanger par un mouvement rotatif et placer dans une étuve à CO_2 à 37°C.

4. Examiner après 18 heures pour connaître le taux d'adhésion.

5. Incuber 6 jours à 37°C.

6. Vidanger le milieu, rincer trois fois au PBS et sécher au séchoir électrique.

7. Fixer 10 min au méthanol absolu.

8. Rincer au PBS.

9. Colorer au Giemsa 1% pendant 45 min (ou Bleu de Toluidine 1% pendant une minute).

10. Vidanger le colorant et rincer à l'eau.

11. Compter, sous le microscope, les colonies formées de cinq cellules ou plus, dans 22 carrés choisis au hasard dans la partie centrale de la boîte de Petri. Il y a 440 carreaux dans une boîte de Petri de 60 mm; 1/20 de la surface est donc compté.

$$\% \text{ cellules ayant formé des colonies} = \frac{\text{Colonies dans 22 carrés} \times 20}{\text{Nombre de cellules ensemencées}}$$

5. CONGÉLATION ET DÉCONGÉLATION

5.1. CONGÉLATION DES CELLULES

1. Trypsiner un ou plusieurs feuillets cellulaires confluents.

2. Suspendre les cellules dans un milieu de croissance contenant 10% de SFV et 10% de DMSO (diméthylsulfoxyde) et ajuster le concentration cellulaire à 1.5×10^6 cellules /mL.

3. Répartir dans des cryotubes de 2 mL et placer 1 mL par ampoule.

4. Placer à 4°C au moins 3 h.

5. Abaisser la température entre 4°C et –25°C des tubes à raison de 1°C/min. Agiter les ampoules avant de commencer la congélation.

6. Lorsque la température a atteint –25°C, abaisser rapidement à –70°C ou moins (azote liquide).

7. Conserver à –70°C ou moins.

Les étapes 4, 5 et 6 sont réalisées dans un appareil automatique. Des méthodes manuelles sont possibles, mais l'appareillage automatique et la conservation sous vapeur d'azote sont préférables car une perte de viabilité peut se produire à –70°C.

5.2. DÉCONGÉLATION ET MISE EN CULTURE

1. Plonger le tube dans un bain-marie à 37°C jusqu'à ce que toute la glace soit fondue.

2. Ouvrir le tube de façon aseptique et placer son contenu dans le milieu de croissance, puis dans un flacon de 25 ou 75 cm^2.

3. Incuber à 37°C.

4. Changer le milieu après 24 h.

5. Effectuer les sous-cultures (trypsiner, diluer, etc.).

6. ÉTALEMENT DE CHROMOSOMES

Cette technique permet d'étaler les chromosomes sur un seul plan; on peut ainsi les identifier et les énumérer afin de caractériser une lignée cellulaire.

1. Obtenir un flacon de 75 cm^2 contenant les cellules à étudier.

2. Ajouter au milieu de culture 0.2 µg/mL de colcémide, incuber 5 h à 37°C, puis trypsiner les cellules.

3. Centrifuger les cellules 10 min à 1000 x *g* et rejeter le surnageant.

4. Ajouter très lentement 2 mL de la solution hypotonique suivante préchauffée à 37°C: 1 mL de SFV dans 14 mL d'eau distillée.

5. Suspendre délicatement les cellules et incuber 30 min à 37°C.

6. Centrifuger 5 min à 1000 x *g* et rejeter le surnageant.

7. Ajouter 3 mL du fixateur suivant, fraîchement préparé: 3 mL de méthanol absolu et 1 mL d'acide acétique glacial (ne pas suspendre les cellules).

8. Incuber 30 min à 20°C, suspendre les cellules, centrifuger 5 min à 1000 x *g*.

9. Rejeter le surnageant et ajouter 2 mL de fixateur fraîchement préparé (voir étape 7).

10. Suspendre les cellules et reprendre les étapes 5 à 7 à deux reprises.

11. Rejeter le surnageant et ajouter juste assez de fixateur pour obtenir une suspension uniforme (déterminée par l'expérience).

12. Laisser tomber 1 ou 2 gouttes de cette suspension sur une lampe propre. Avant l'utilisation, les lames sont conservées dans un bain d'eau distillée; on enlève le surplus d'eau juste avant l'usage.

13. Sécher rapidement au séchoir électrique.

14. Colorer 6 min dans une solution 1/50 (fraîchement préparée) de Giemsa.

15. Rincer à l'eau distillée, sécher puis monter sous lamelle.

16. Trouver les étalements complets par microscopie, et procéder à l'identification et au comptage.

7. RÉFÉRENCE

Freshney, R. I. 1987. *Culture of animal cells. A manual of basic techniques.* 2e Edition. Alan R. Liss Inc, New York, 397 pages.

3

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES VIRUS

Pierre Payment et Michel Trudel

1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Plusieurs des échantillons soumis pour examen virologique sont contaminés par des bactéries ou des champignons et il est nécessaire de les centrifuger et de les traiter avec des antibiotiques.

La **solution concentrée d'antibiotiques (100X)** contient 10 000 unités de pénicilline, 10 000 µg de streptomycine et parfois 100 µg d'amphotéricine B par millilitre (Pen-Strep-Amph). On l'utilise à 1 ou 2% en cultures cellulaires et à 5 à 10% pour les échantillons cliniques.

1.1. SELLES

1. Placer 5 g de selles et 50 mL de PBS dans une bouteille stérile de 100 mL contenant 20-25 billes de verre de 4-5 mm.

2. Émulsionner jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.

3. Décanter et centrifuger à 3000 x *g* pendant 60 min à 4°C.

4. Recueillir 10 mL de surnageant et y ajouter 0.5 mL de la solution d'antibiotiques 100X.

5. Laisser 1 h à 4°C.

6. Ensemencer sur cultures cellulaires (0.3 mL par tube en macrotechnique et 50 µL par cupule en microtechnique), ou inoculer à des oeufs embryonnés ou à des souriceaux.

7. Observer les cultures cellulaires tous les deux jours.

8. Lorsqu'un effet cytopathique se manifeste, ou après 10 jours, recueillir le surnageant de la culture et le réensemencer sur de nouvelles cultures.

9. Observer tous les deux jours pendant 10 jours ou aussi longtemps que les cultures témoins se conservent en bon état. Si une dégénérescence caractéristique se produit, typer le virus. Sinon, il faudra considérer l'échantillon négatif, à moins que les oeufs ou les souriceaux aient présenté des lésions.

1.2. ÉCOUVILLONS ET LIQUIDES BIOLOGIQUES

Les écouvillons devront avoir été placés dans 2-3 mL de milieu de transport (milieu 199–base de Hank, 2% de SFV et 5% de la solution d'antibiotiques).

1. S'il s'agit d'un écouvillon, bien le presser dans le milieu de transport pour en extraire l'échantillon.

2. Si le liquide est contaminé (trouble) et, en particulier, s'il s'agit d'un écouvillon rectal, centrifuger 30 min à 3 000 x *g* à 4°C.

3. Ajouter 5% de la solution d'antibiotiques 100X.

4. Laisser 60 min à 4°C.

5. Ensemencer sur cultures cellulaires ou inoculer à l'oeuf embryonné ou au souriceau.

1.3. TISSUS

1. Broyer le tissu dans un mortier ou dans un homogénéisateur mécanique avec suffisamment de PBS pour obtenir une suspension à 20%.

2. Centrifuger 30 min à 3000 x *g* à 4°C.

3. Ajouter 5% de la solution d'antibiotiques 100X.

4. Ensemencer sur cultures cellulaires ou inoculer à des souriceaux.

1.4. ORGANES DE SOURICEAUX

Il faut procéder de la même façon que pour les tissus, mais en prenant soin de laver les tissus pour les débarrasser de la glycérine tamponnée, s'ils y ont été conservés.

2. INOCULATION À L'OEUF EMBRYONNÉ

2.1. VOIE AMNIOTIQUE

Utiliser des oeufs de 7 jours pour le virus des oreillons et des oeufs de 11 jours pour le virus de l'influenza.

1. Désinfecter la coquille au niveau de la chambre à air avec une gaze imbibée d'alcool à 70%.

2. Pratiquer dans la coquille une ouverture de 1 cm de diamètre en utilisant des ciseaux stérilisés.

3. Éclaircir la membrane coquillière avec une goutte d'alcool à 15%.

4. Injecter 0.2 mL d'échantillon dans la cavité amniotique de l'oeuf (3 oeufs par échantillon). Viser l'oeil de l'embryon. Utiliser une seringue de 1 mL munie d'une aiguille 26G–3/8.

5. Fermer l'ouverture avec du pansement adhésif stérile.

6. Incuber dans une étuve humidifiée en position verticale à 33°C pour le virus de l'influenza ou à 37°C pour le virus des oreillons.

7. Mirer les oeufs après 24 h et rejeter ceux dont l'embryon est mort.

8. Recueillir après 2–4 jours pour le virus de l'influenza ou après 5–7 jours pour le virus des oreillons.

9. Placer les oeufs pendant 18 h à 4°C (ou 30 min à –20°C) pour tuer l'embryon.

10. Agrandir l'ouverture de la coquille et replier la membrane chorio-allantoïde sur celle-ci à l'aide d'une pince stérilisée.

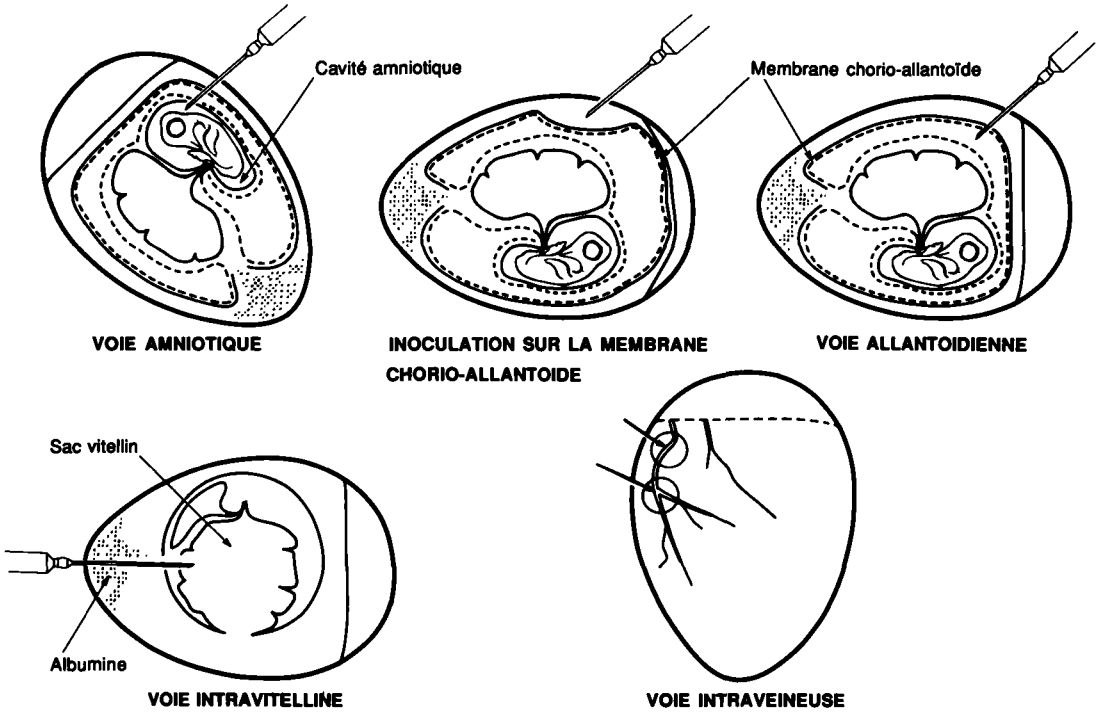


Figure 1

Voies d'inoculation à l'oeuf embryonné

11. Écarter l'embryon avec la pince et aspirer le liquide allantoïde avec une pipette de 10 mL.

12. Pencher l'oeuf de façon à faire sortir la tête de l'embryon. A l'aide d'une seringue de 5 mL (aiguille 20G-1 1/2"), transpercer la membrane amniotique et aspirer le liquide amniotique.

13. Effectuer les épreuves appropriées sur les liquides recueillis (hémagglutination, fixation du complément, ELISA, hémadsorption, etc.).

2.2. VOIE ALLANTOÏDE

Utiliser des oeufs de 7 jours pour le virus des oreillons et de 11 jours pour le virus de l'influenza. Il faut procéder de la même façon que pour la voie amniotique, mais en faisant une inoculation peu profonde au travers de la membrane chorio-allantoïde en visant le côté de la coquille afin d'éviter la cavité amniotique. De plus, il n'est pas nécessaire de poursuivre après l'opération 11, section 2.1.

2.3. VOIE VITELLINE

1. Mirer des oeufs embryonnés de 6 jours et s'assurer de leur vitalité.

2. Avec un mire-oeufs, localiser l'extrémité de la membrane vitelline (côté opposé à la chambre à air).

3. Désinfecter la coquille à l'alcool 70%. Avec une aiguille stérilisée, pratiquer une ouverture ponctiforme dans la chambre à air.

4. Inoculer 0.25 à 0.50 mL d'échantillon à l'aide d'une seringue de 1 mL (aiguille 22G–11/2") à l'extrémité opposée à la chambre à air.

5. Obturer les deux extrémités avec du ruban chirurgical.

6. Incuber dans une étuve à la température la plus favorable à la multiplication du virus recherché.

7. Examiner quotidiennement et rejeter les oeufs qui meurent prématurément (en deçà de 24 h).

8. À la fin de l'incubation, prélever le liquide vitellin: insérer une aiguille 18G–11/2", montée sur une seringue de 5 mL, dans la cavité vitelline (ouverture opposée à la chambre à air) et prélever de 2 à 5 mL.

2.4. VOIE INTRAVEINEUSE

1. Mirer des oeufs embryonnés de 11 jours et s'assurer de leur vitalité.

2. Repérer la grosse veine de la membrane chorio-allantoïde et la direction du flux sanguin.

3. Décontaminer la coquille à l'alcool 70%.

4. Découper dans la coquille une ouverture triangulaire au-dessus de la veine.

5. Injecter 50 µL dans le sens de la circulation, avec une seringue à tuberculine en verre (aiguille 26 G–3/8"). Retirer l'aiguille doucement, le biseau vers le haut (cette étape est plus facilement réalisée en utilisant le mire-oeufs).

6. Fermer l'ouverture avec du pansement adhésif stérile.

7. Incuber à la température appropriée.

8. Mirer les oeufs après 24 h et rejeter les embryons morts.

9. Mirer à chaque jour et placer les embryons morts à 4°C pour la nuit. Le lendemain, prélever le liquide ou l'embryon pour analyses subséquentes.

2.5. MEMBRANE CHORIO-ALLANTOÏDE

1. Mirer des oeufs de 11 jours et s'assurer de leur vitalité.

2. À l'aide du mire-oeufs, repérer l'endroit près de la chambre à air où la membrane chorio-allantoïde est la plus développée.

3. À l'aide d'une aiguille stérilisée, percer un trou dans la chambre à air après avoir désinfecté la coquille à l'alcool.

4. Faire un petit trou dans la coquille et la membrane coquillière puis pratiquer une ouverture triangulaire à l'aide d'une pince fine (attention à la membrane chorio-allantoïde).

5. La membrane chorio-allantoïde devrait s'affaisser. Si rien ne se produit, appliquer, à l'aide d'une poire, une succion douce au niveau du trou de la chambre à air.

6. Déposer 50 µL d'échantillon sur la membrane affaissée (ne pas tourner les oeufs après l'inoculation).

7. Obturer les deux ouvertures avec du ruban adhésif stérile.

8. Incuber à la température optimale pour la croissance du virus étudié (37°C pour les virus pox et herpès).

9. Mirer et rejeter les embryons qui meurent en deçà de 24 h.

10. Prélever la membrane chorio-allantoïde après 3 jours:

a) placer l'oeuf sur un portoir, le côté d'inoculation vers le haut

b) coller un ruban adhésif sur la coquille

c) couper la partie supérieure de la coquille à l'aide de ciseaux stérilisés

d) détacher la membrane chorio-allantoïde et placer cette substance dans une boîte de Petri contenant de la saline et 5% de formol pour inactiver le virus

e) placer la boîte de Petri sur une surface sombre pour faciliter l'observation des foyers d'infection ("pocks").

3. ISOLEMENT SUR CULTURES CELLULAIRES

3.1. CHOIX

Certaines cellules étant sensibles à plusieurs types de virus, on ne peut utiliser d'utiliser, pour l'isolement des virus, que quelques types cellulaires. Les trois types suggérés sont:

- une culture primaire
- une culture de cellules diploïdes
- une culture de cellules en lignées continues (hétéroploïdes)

Dans nos laboratoires, les cellules utilisées pour représenter chacun de ces types sont respectivement:

- des cultures primaires de cellules de rein de singe cercopithèque (RC) ou de singe rhésus (RRh)
- des cellules IMPH (Institut de Microbiologie–poumon humain) et WI–38 (Wistar–38); toutes deux sont des cellules embryonnaires de poumon humain
- des cellules Hep–2 (carcinome humain de larynx)

3.2. ISOLEMENT

La première étape est l'ensemencement des cultures cellulaires de l'échantillon préparé plus tôt. Les techniques d'identification des virus seront décrites plus loin.

3.2.1. Macrotechnique

1. Préparer les cultures cellulaires en tubes (1.5 mL/tube).

2. Vidanger le milieu, à la confluence du feuillet cellulaire.

3. Ensemencer 0.3 mL dans trois tubes de chaque type cellulaire utilisé et compléter avec 1.2 mL de milieu de culture (voir les sections précédentes pour la préparation des échantillons).

4. Incuber à 37°C.

5. Observer à tous les deux jours.

6. Réensemencer 0.3 mL sur de nouvelles cultures, à l'apparition d'un effet cytopathique ou après 10 jours.

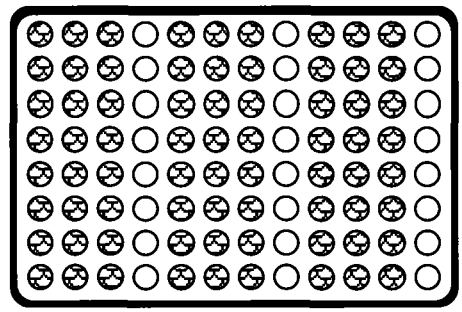
7. Incuber à 37°C et observer à tous les deux jours.

8. Effectuer l'une des opérations suivantes, à l'apparition de l'effet cytopathique, ou après 10 jours:

- observer au microscope électronique
- typer par séroneutralisation (s'il y a un effet cytopathique)
- effectuer une hémadsorption (si le virus soupçonné est hémadsorbant)
- effectuer un "challenge" avec le virus écho 11 (si l'on croit qu'il s'agit du virus de la rubéole)
- faire une coloration hémalun-éosine ou Giemsa si la dégénérescence est typique du virus herpétique (dans ce cas, il est préférable d'utiliser des tubes Leighton).

3.2.2. Microtechnique

1. Ensemencer dans un plateau à 96 cupules, à fond plat des cellules utilisées (0.1 mL/ cupule dans du milieu de croissance): 199–Hank: MEM–Earle (1:1), 10% SFV et 1% de la solution d'antibiotiques (100X). Les cellules seront ensemencées aux concentrations suivantes: rein de singe à 130 000 cellules/mL, lignée hétéroploïde (Hep–2) à 50 000 cellules/mL, diploïdes (WI–38) à 150 000 cellules/ mL. Distribuer ces cellules comme l'indique la figure à raison de 0.1 mL/cupule.



C1 C2 C3 C1 C2 C3 C1 C2 C3

C1 = cellules de rein de singe cercopithèque
C2 = cellules diploïdes humaines
C3 = cellules en lignée hétéroploïdes

2. Incuber les cultures à 37°C dans une étuve à CO_2 (5%) humidifiée.

3. Vidanger le milieu par inversion sur des gazes stérilisées (trois épaisseurs) ou par aspiration, avant d'ensemencer les échantillons ou les passages.

4. Ensemencer 50 µL d'échantillon dans au moins 8 cupules par type cellulaire, dans les rangées 1 à 3 ou 9 à 11.

5. Ajouter 100 µL de milieu de maintien (MEM–Earle, 2% SFV, antibiotiques).

6. Incuber à 37°C dans une étuve à CO_2.

7. Observer à tous les 2 jours jusqu'à l'apparition d'un effet cytopathique bien marqué ou pendant 10 jours.

8. Faire un second passage.

9. Typer, si positif, tel que décrit pour la macrotechnique.

4. IDENTIFICATION DES VIRUS

4.1. HÉMAGGLUTINATION

Plusieurs virus peuvent être mis en évidence, par une réaction d'agglutination d'hématies. Pour chaque virus recherché, il faut sélectionner les conditions appropriées: provenance des hématies, tampon et température de réaction.

4.1.1. Tampons

Saline

NaCl ..... 8.5 g

H_2O ..... à 1 L

Saline phosphatée (PBS) (usage général) (pH 7.2)

NaCl ..... 8.5 g

Na_2HPO_4 ..... 1.1 g

$NaH_2PO_4.H_2O$ ..... 0.3 g

H_2O ..... à 1.0 L

Saline boratée (pour Togavirus) (pH 9)

Solution mère de saline boratée pH 9 (SB)

Acide borique 0.5 M (30.92 g/L solubilisé dans H_2O bouillante) ..... 100 mL

NaCl 0.15 M ..... 80 mL

NaOH 1 M ..... 24 mL

H_2O ..... à 1 L

Solution mère d'albumine sérique ovine (ASB)

Albumine sérique bovine (fraction V) ..... 4 g

Saline boratée pH 9 ..... 90 mL

Ajuster à pH 9 avec du NaOH 2N, puis compléter à 100 mL avec de l'eau distillée.

Saline boratée – albumine sérique bovine (SBASB)

Solution mère d'albumine ..... 100 mL

Saline boratée pH 9 ..... 900 mL

NOTE: Stériliser ces solutions par filtration aseptique sur filtre 0.22 µm.

Saline phosphatée (pH variable)

Solutions mères

NaCl 1.5 M ..... 88 g/L

Na_2HPO_4 2 M ..... 284 g/L

$NaH_2PO_4.H_2O$ 2 M ..... 276 g/L

Solutions de travail

Solution 1

1.5 M NaCl ..... 100 mL

2.0 M Na_2HPO_4 ..... 100 mL

H_2O ..... à 1 L

Solution 2

1.5 M NaCl ..... 100 mL

2.0 M $NaH_2PO_4.H_2O$ ..... 100 mL

H_2O ..... à 1 L

Mélanger les solutions 1 et 2 selon le tableau suivant pour obtenir le pH indiqué lorsque ces solutions sont mélangées avec un volume égal de saline boratée-albumine bovine (SBAB):

pH final	mL de 1	mL de 2
5.7	3.0	97.0
6.0	12.5	87.5
6.2	22.0	78.0
6.4	32.0	68.0
6.6	45.0	55.0
6.8	55.0	45.0
7.0	64.0	36.0
7.2	72.0	28.0
7.4	79.0	21.0

Alsever (pH 6.1)

Dextrose, anhydre ..... 2.05 g

Citrate de sodium ..... 0.80 g

Acide citrique ..... 0.55 g

NaCl ..... 0.42 g

H_2O ..... à 1 litre

Dextrose-Gélatine-Véronal (DGV) (pH 7.3)

Barbital (acide barbiturique) ..... 0.58 g

Gélatine ..... 0.60 g

Barbital de sodium ..... 0.38 g

$CaCl_2$ ..... 0.02 g

$MgSO_4.7H_2O$ ..... 0.12 g

NaCl ..... 8.50 g

Dextrose ..... 10.0 g

H_2O ..... à 1 L

Dissoudre séparément le barbital et la gélatine dans 250 mL d'eau chauffée, puis mélanger les autres réactifs.

4.1.2. Préparation des hématies

1. Prélever le sang par vénipuncture, ou ponction cardiaque, dans quatre fois leur volume d'Alsever.
2. Centrifuger à 1000 x *g* 15 min.
3. Rejeter le surnageant et suspendre le culot d'hématies dans le volume initial du tampon qui servira à l'hémagglutination.
4. Reprendre les étapes 2 et 3 trois fois.

NOTE: Pour toutes les épreuves d'hémagglutination destinées à mettre un virus en évidence, on doit toujours inclure dans l'épreuve les témoins appropriés, par exemple les liquides amniotique, vitellin ou allantoïde provenant d'oeufs non inoculés ou encore du surnageant de cultures cellulaires non infectées.

4.1.3. Caractéristiques des hémagglutinines de quelques virus

Virus de la rubéole

Le virus de la rubéole agglutine les hématies de poussin d'un jour (0.25%) dans le tampon DGV à 4°C en 1 h. Un traitement au Tween–80–éther augmente parfois le titre hémagglutinant.

Virus de la rougeole

Le virus de la rougeole agglutine les hématies de singe cercopithèque (1%) dans la saline phosphatée (pH 7.2) à 37°C en 1 h.

Virus des oreillons

Le virus des oreillons peut agglutiner les hématies de poule (0.5%) dans de la saline à 4°C en 1 h ou des hématies de cobaye dans les mêmes conditions, mais en 90 min. Le titre hémagglutinant peut parfois être augmenté par un traitement au Tween 80-éther de la préparation.

Réovirus

Les réovirus agglutinent les hématies humaines de type 0 (0.4%) dans de la saline à 20°C en 1 h.

Adénovirus

Les adénovirus ont été classifiés en quatre groupes d'agglutination:

Groupe I : agglutinent les hématies du singe rhésus. Ce sont les types 3, 7, 11, 14, 16, 20, 21, 25 et 28.

Groupe II : agglutinent les hématies du rat. Ce sont les types 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 22, 23, 24, 26 et 27.

Groupe III : agglutinent peu les hématies du rat mais dont l'hémagglutination est augmentée en présence d'un sérum immun hétérotypique (contre un autre sérotype). Ce sont les types 1, 2, 4, 5 et 6.

Groupe IV : aucune mise en évidence d'hémagglutinine.

Les deux espèces d'hématies sont diluées à 0.4%, dans le tampon DGV. L'hémagglutination est mise en évidence en 1 h à 37°C. Afin d'éliminer une agglutination non spécifique des hématies, on peut ajouter du sérum normal de lapin. On l'utilise dans le tampon à la concentration minimale permettant la formation d'un bouton bien défini des hématies.

Entérovirus

Plusieurs entérovirus peuvent agglutiner les hématies humaines "O" en saline phosphatée à pH 5.8 ou 7.4 à 4°C ou à 37°C. La mise en évidence de ces hémagglutinines n'apporte rien à l'identification des entérovirus et est donc peu utilisée.

Togavirus

L'hémagglutination de ces virus est dépendante du pH, et chaque antigène inconnu doit être évalué dans une gamme de tampon de pH 5.2 à 7.4. On utilise la saline phosphatée décrite plus haut et des hématies de poule ou d'oie (0.4%). Les préparations sont incubées 30 min à 22°C ou 37°C.

Virus influenza

Les virus influenza agglutinent les hématies humaines "O" et celles de cobaye et de poule, toutes à 0.5% en saline phosphatée à 22°C. On laisse sédimenter jusqu'à ce que les hématies témoins déposent.

Virus para-influenza

Les virus para-influenza agglutinent les hématies humaines "O" et celles de cobaye (0.5%) en saline phosphatée (pH 7.2) à 22 ou 37°C en 1 h.

4.1.4. Titrage d'un virus hémagglutinant

La technique décrite ici est une technique d'application générale qui a pour but de

familiariser le lecteur avec l'utilisation des microtechniques.

1. Dans la première cupule d'un plateau, placer 50 µL de l'antigène viral à titrer.

2. Dans toutes les autres cupules de la rangée, placer 25 µL de tampon.

3. Diluer l'antigène à l'aide de fourchettes à dilution de 25 µL à partir de la première cupule.

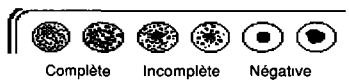
4. Ajouter 25 µL d'une suspension d'hématies à la concentration appropriée.

5. Incuber à la température appropriée.

6. Lire les résultats.

Le titre d'un antigène viral est l'équivalent de la dernière dilution de l'antigène qui agglutine complètement ou partiellement les hématies. Cette dilution contient une unité hémagglutinante de cet antigène viral.

Interprétation des résultats:



Agglutination complète

Les hématies sont distribuées en un tapis uniforme au fond de la cupule. Parfois, les fourchettes à dilution vont marquer le fond de la cupule; les hématies auront alors un aspect plus rugueux que l'on ne devra pas confondre avec une agglutination incomplète.

Agglutination incomplète

Les hématies non agglutinées sédimentent en un anneau plus ou moins épais sur un tapis d'hématies agglutinées.

Agglutination négative

Les hématies non agglutinées sédimentent en un "bouton" compact au centre de la cupule.

Afin de confirmer l'isolement d'un virus ou encore d'en déterminer le sérotype, on peut utiliser des antisérums spécifiques qui réagissent avec le virus et l'empêcheront d'agglutiner les hématies: c'est l'épreuve d'**Inhibition de l'hémagglutination**. La description de cette technique est présentée au Chapitre 12.

4.2. HÉMADSORPTION

4.2.1. Mise en évidence

Les virus possédant des hémagglutinines peuvent provoquer l'attachement d'hématies aux cellules qu'ils infectent: c'est l'hémadsorption. La plupart des myxovirus provoquent ce phénomène; nous décrivons la technique telle appliquée à ces virus.

1. Préparer une suspension d'hématies de cobaye à 10% dans du PBS et la conserver à 4°C. Préparer une suspension à 0.5% en mélangeant 1 mL de cette suspension à 19 mL de PBS.

2. Vidanger le surnageant des cultures ensemencées et des cultures témoins (conserver le surnageant des cultures infectées pour la microscopie électronique).

3. Ajouter à chaque tube 0.2 mL de la suspension d'hématies (50 µL en microtechnique).

4. Incuber 30 min à 4°C.

5. Laver les cultures trois fois au PBS à 4°C.

6. Observer l'hémadsorption au microscope et graduer de négative (0) à complète (4) selon la quantité d'hématies adsorbées. Il faut bien observer les cultures témoins car des hématies vieillies ou des infections virales latentes des cellules utilisées peuvent résulter en une hémadsorption non spécifique.

7. Incuber 60 min à 37°C: les virus possédant une neuraminidase vont s'éluer.

8. Noter s'il y a eu élution.

4.2.2. Inhibition de l'hémadsorption

L'inhibition de l'hémadsorption permet d'identifier les virus hémadsorbants par blocage de l'hémadsorption à l'aide d'antisérums spécifiques.

1. Infecter les cellules avec le virus hémadsorbant (quatre tubes ou quatre cupules).

2. Incuber pendant 5 à 7 jours à 37°C.

3. Vidanger le milieu et rincer les feuillets au PBS.

4. Préparer une dilution 1/10 d'un antisérum spécifique et placer sur la moitié des cultures: deux tubes ou cupules, 0.2 mL/tube, 0.05 mL/cupule. Sur l'autre partie des cultures, placer 0.2 mL (ou 0.05 mL) de PBS.

5. Incuber 60 min à 37°C.

6. Ajouter 0.2 mL ou 0.05 mL de la suspension d'hématies à 0.5%.

7. Incuber 20 min à 4°C.

8. Observer à faible grossissement au microscope. Si l'hémadsorption est bloquée dans les cultures ayant reçu l'antisérum, celui-ci est considéré comme étant spécifique et le virus identifié.

Une variante de cette technique est utilisée de la façon suivante: l'inoculum et l'antisérum (1:1) sont incubés à 37°C pendant une heure et l'on dépose 0.05 mL de cette suspension dans les cupules appropriées. Après incubation pendant 5 à 7 jours à 33°C, rincer les feuillets et procéder comme il a été précédemment décrit en 6, 7 et 8.

4.3. EFFETS CYTOPATHIQUES

Lorsqu'ils se développent dans des cellules ou cultures, certains virus provoquent des changements morphologiques typiques. L'effet cytopathique est gradué de négatif à 4+ de la façon suivante:

1+ 25% ou moins des cellules sont infectées et l'effet cytopathique se manifeste par foyers seulement.

2+ 25 à 50% des cellules montrent un effet cytopathique.

3+ 50 à 75% des cellules montrent un effet cytopathique.

4+ 75 à 100% des cellules montrent un effet cytopathique.

Entérovirus

Seuls les virus suivants provoquent un effet cytopathique sur les cultures cellulaires: polio 1, 2, 3; coxsackie B1 à B6, coxsackie A7 et A9 Echo 1 à 34. Cet effet cytopathique se manifeste généralement par un arrondissement des cellules suivi du décollement des cellules du feuillet.

Adénovirus

Les adénovirus provoquent un arrondissement des cellules et une augmentation de la réfringence. Les cellules dégénérées marquent une forte tendance à l'agrégation.

Myxovirus

Les virus influenza, oreillons, respiratoire syncytial, rougeole et SV–5 provoquent des effets cytopathiques caractéristiques:

- Influenza et oreillons (pas toutes les souches): seulement 10% des cellules sont affectées; elles deviennent granuleuses et arrondies.
- Rougeole: formation de cellules géantes (syncytiums) ayant la forme d'un anneau. Certaines cellules s'allongent en fuseau. L'effet cytopathique n'atteint que 50% du feuillet.
- SV–5: semblable à celui de la rougeole, mais les syncytiums n'ont pas l'apparence d'un anneau.
- Respiratoire syncytial: formation de syncytiums (cellules géantes multinucléées).

Herpesvirus

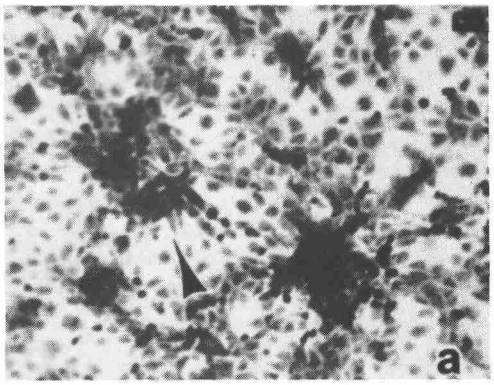
L'infection par ces virus produit des cellules géantes multinucléées.

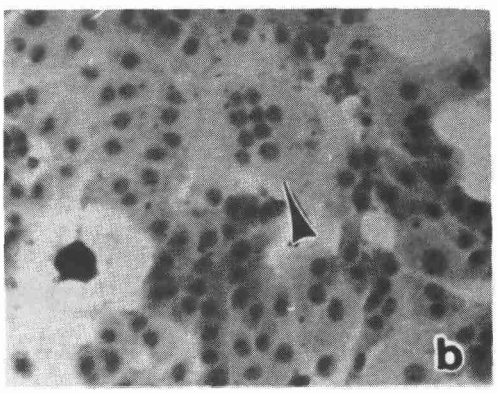
Virus simiens

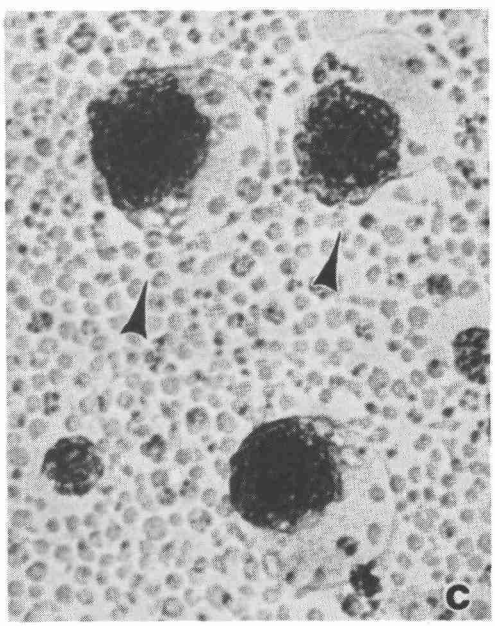
Le virus spumeux et le virus SV–40 provoquent une vacuolisation cellulaire caractéristique. Ces virus sont souvent présents dans les cultures de cellules normales de rein de singe.

Propriétés hémagglutinantes des virus humains

Virus	Type d'hématies	%	Température d'incubation	Traitement des sérums
Coxsackie A20, 21, 24 Echo 3, 11, 19, 13	Homme, type O	0.4%	4°C	Kaolin
Coxsackie B 1, 3, 5 Echo 6, 7, 12, 20, 21, 24, 29, 30	Homme, type O	0.4%	37°C	Kaolin
Coxsackie A7	Poulet	0.4%	22°C	Kaolin
Réo	Homme, type O	0.4%	22°C	Kaolin
Influenza (isolement frais) A.B, Para 1, 2, 3, Sendai	Homme, type O ou cobaye (frais)	0.4%	22°C	Receptor Destroying Enzyme (RDE), adsorption
Oreillons Influenza C, (A, B adapté)	Poulet	0.4%	22 et 4°C	RDE, adsorption
PVM	Souris	0.4%	22°C	
Corona	Poulet, rat, souris	0.4%	22°C	Adsorption
Rougeole	Cerco, rhésus	0.4%	37°C	Adsorption
Vaccine	Poulet	0.4%	22°C	Adsorption
Adéno I	Rhésus	0.4%	37°C	Adsorption
Adéno II, III	Rat	0.4%	37°C	Adsorption
Polyome	Cobaye	0.4%	4°C	RDE
Virus K	Mouton	0.4%	4°C	
Virus H	Cobaye	0.4%	22°C	Kaolin, adsorption
Rubéole	Poussin (24 h)	0.25%	4°C	Hep-$MnCl_2$, adsorption
Togavirus Alpha	Poussin (24 h)	0.25%	22-37°C	Kaolin, adsorption
Flavivirus	Poussin (24 h)	0.25%	22-37°C	Kaolin, adsorption







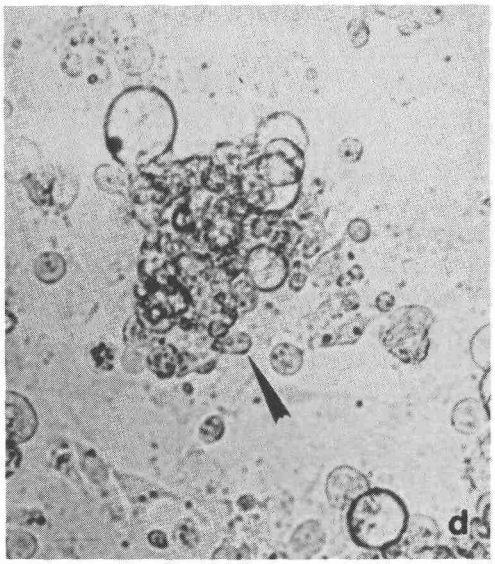


Figure 2

Exemples d'effets cytopathiques causés par quelques virus

Foyers d'infection causés par la multiplication du virus de la rubéole dans les cellules de rein de lapin (RK-13) (a). Syncytiums formés lors de l'infection de cellules Hep-2 par le virus respiratoire syncytial humain (b). Syncytiums formés lors de l'infection de cellules CEM par le virus de l'immunodéficience humaine (c) (photographie: Dr Lise Thibodeau, Institut Armand-Frappier). Foyers d'infection et hypertrophie cellulaire lors de l'infection de fibroblastes de *Lapomis macrochirus* (Bluegill fry) par le virus de lymphocystose (d) (photographie: Joël Heppel, Institut Armand-Frappier)

4.3.1. Titrage de virus par effet cytopathique

Cette technique de titrage peut être appliquée à tous les virus provoquant un effet cytopathique caractéristique. Le titre du virus sera évalué par une formule statistique en fonction du nombre de cupules inoculées. Ce titrage peut être réalisé soit en ensemençant le virus sur un feuillet établi ou encore en mélangeant le virus au moment de la préparation des cellules.

1. Préparer des dilutions décimales du virus à titrer dans du milieu de maintien (changer de pipette à chaque dilution).

2. Vidanger le milieu et ensemencer 25 µL de chaque dilution dans les cupules appropriées (voir exemple) de plateaux à 96 cupules à fond plat (préparées à l'avance pour que le feuillet soit confluent au moment de l'ensemencement).

3. Ensemencer 25 µL de chaque dilution dans quatre cupules (ou plus). Plus on utilise de cupules, plus la précision du titre obtenu sera grande. En général, on utilisera le même nombre de cupules que le facteur de dilution utilisé.

4. Ajouter 0.1 mL de milieu de maintien à toutes les cupules. Conserver quelques cupules comme témoins cellulaires. Il est bon de titrer à chaque fois un virus témoin réparti en volumes de 1-2 mL et de le conserver à –70°C.

5. Incuber à 37°C.

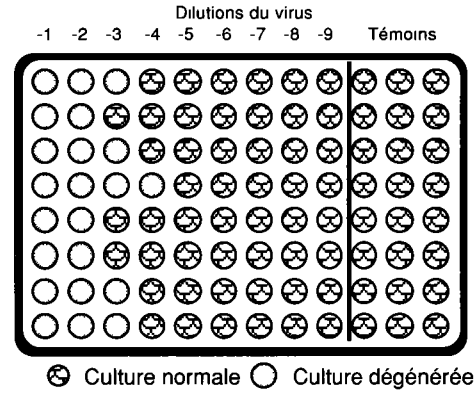
6. Lire à tous les jours et noter les cupules dans lesquelles les cellules sont dégénérées.

7. Lorsque l'effet cytopathique a cessé de progresser (après 3 à 10 jours), évaluer le titre infectieux soit par la méthode de Reed et Muench, soit par la méthode Kärber.

4.3.2. Détermination du titre infectieux

4.3.2.1. Méthode de Reed-Muench

Il faut déterminer les dilutions chevauchant le point 50%, 10^{-3} et 10^{-4} dans l'exemple suivant.



La dose infectieuse en culture de tissus est évaluée selon la formule suivante:

$$\text{DICT50} = \text{Dilution supérieure} + \frac{\%\text{ dil. sup. à } 50\% - 50\%}{\%\text{ dil. sup. à } 50\% - \%\text{ dil. inf. à } 50\%} \times \log_{10}(\text{dil.})$$

Dans l'exemple précédent, où les dilutions sont décimales

$$\text{DICT}_{50} = 3 + \frac{62.5\% - 50\%}{62.5\% - 12.5\%} \times \log_{10}(10)$$

donc:

$$\text{DICT}_{50} = 3 + \frac{12.5}{1.50} = 3.25/0.025\text{ mL}$$

ou de $10^{4\,85}$ /mL (on doit ajouter 1.6, le $\log_{10}$ de 40).

4.3.2.2. Méthode de Kärber

Cette méthode utilise la formule suivante pour apprécier la dose infectieuse 50%:

$DICT_{50} = -\Delta - \delta\ (S - 0.5)$

où Δ = $\log_{10}$ de la dilution montrant 100% de dégénérescence

δ = $\log_{10}$ du facteur de dilution
$\log_{10} 10 = 1.0$
$\log_{10} 5 = 0.7$
$\log_{10} 2 = 0.3$

S = somme des cupules (ou tubes) dégénérées, incluant celles de la dilution où il y a 100% de dégénérescence. Cette dernière a pour valeur l'unité, et chaque autre dilution une fraction de l'unité.

Dans l'exemple précédent:

Δ = –2, dernière dilution où 100% **(8/8) des cultures sont dégénérées**

δ = 1 ou $\log_{10} 10$ puisque des dilutions décimales ont été utilisées

S = 1.750 car à la dilution

–2: 8/8 donc 1.000

–3: 5/8 donc 0.625

–4: 1/8 donc 0.125

–5:. 0/8 donc 0.000

Somme = 1.750

En remplaçant ces valeurs dans l'équation:

$DICT_{50} = \Delta - \delta\ (S - 0.5)$

$DICT_{50} = -2 - (1)\ (1.75 - 0.5)$

$DICT_{50} = -2 - 1.250$

$DICT_{50} = -3.25$

$DICT_{50} = 10^{-3.25}/0.025$ mL

Dans tous les cas, si une précision plus élevée ou moins élevée est requise, on pourra utiliser plus ou moins de cupules par dilution (3, 4, 5, 12, etc.) selon les besoins et titrer plusieurs virus par plateau.

4.4. TITRAGE PAR PLAGES

4.4.1. Entérovirus

Certains virus, dont les entérovirus, provoquent des plages de lyse dans le feuillet cellulaire en milieu nutritif gélifié. Ces plages ayant pour origine une seule particule infectieuse, il est possible de titrer un virus avec une grande précision.

1. Préparer des cellules, sensibles au virus étudié, dans des flacons de 25 cm^2.

2. Vidanger le milieu à la confluence.

3. Préparer des dilutions décimales du virus à titrer dans un milieu de maintien.

4. Ensemencer deux flacons par dilution à raison de 0.4 mL/flacon.

5. Incuber 1 h à 37°C en prenant soin d'agiter délicatement les flacons à toutes les 15 min afin de favoriser l'adsorption du virus.

6. Préparer le milieu à base d'agar, pendant cette incubation:

Solution A

MEM-Earle (10X) ..... 20 mL

Glutamine (200 mM) ..... 2 mL

Sérum de fœtus de veau ..... 4 mL

$NaHCO_3$ 7.5% ..... 5 mL

Rouge neutre (1:1 000) ..... 3 mL

Penicilline 10 000 U/mL

streptomycine 10 000 µg/mL ... 2 mL

H_2O ..... 64 mL

Total ..... 100 mL

Stériliser en autoclavant 20 min à 120°C. Placer l'agar chaud dans un bain-marie à 45-47°C pendant 15-20 min. Agiter après quelques minutes pour en assurer l'uniformité.

Solution B

Bacto-Agar ..... 3 g

H_2O ..... 100 mL

Solution de travail

Mélanger A et B en volumes égaux et placer au bain-marie à 45-47°C. Il ne faut pas les préparer plus de 15 min à l'avance car les constituants du milieu de culture s'inactivent rapidement à cette température.

7. À l'aide d'une seringue semi-automatique, placer 5-7 mL de milieu à base d'agar sur la face opposée au feuillet cellulaire (ceci permet au milieu de se refroidir avant de toucher les cellules; une température de plus de 40°C pouvant tuer les cellules. Prendre garde car le milieu se solidifie entre 37 et 40°C. Inverser le flacon et répartir le milieu sur le feuillet cellulaire.

8. Protéger les flacons de la lumière et laisser 30 min à la température de la pièce pour permettre la solidification du milieu.

9. Incuber à 37°C en position inversée (le feuillet en haut) à l'abri de la lumière.

10. Compter le nombre de plages à 48 et 72 h.

11. Le titre du virus en unités formant des plages (ufp) est calculé de la façon suivante à partir des flacons contenant si possible entre 25–70 plages:

$$\text{ufp/mL} = \frac{\text{Plages dans "n" bouteilles}}{n} \times \text{dilution} \times \frac{10}{4}$$

Exemple: si à la dilution 10^{-6}, il y a respectivement 58 et 51 plages dans les deux flacons (n= 2) où l'on a ensemencé 0.4 mL, le titre sera le suivant:

$$\text{ufp/mL} = \frac{109}{2} \times 10^{-6} \times \frac{10}{4}$$

et

$$\text{ufp/mL} = 136 \times 10^6 \text{ ufp/mL ou } 10^{8.13} \text{ ufp/mL}$$

Le facteur 10/4 ramène le titre infectieux par mL puisque 0.4 mL de virus a été inoculé.

Certains virus ne produiront des plages que sous un milieu semi-solide: on utilisera alors le méthyl cellulose qui est semi-solide à 37°C et semi-liquide à 4°C. Cette substance est utilisée à 1% (p/v) après avoir été autoclavée: elle aura alors l'apparence d'une pâte épaisse qui pourra

être solubilisée en la plaçant à 4°C ou sur la glace pendant quelques heures.

4.4.2. Autres virus

Certains virus provoquent un effet cytopathique, mais malheureusement, celui-ci est lent ou peu marqué. La présence du rouge neutre dans le milieu de culture rend celui-ci toxique pour les cellules pendant de longues incubations. Il est alors préférable de procéder en deux étapes: une première incubation avec agar sans rouge neutre, puis une seconde de 24 à 48 h avec le colorant. Procéder comme il a été décrit pour les entérovirus en omettant le rouge neutre, incuber 7 à 10 jours, puis rajouter 5 mL de milieu avec agar et rouge neutre.

Pour d'autres virus, il est nécessaire de favoriser la production des plages. L'addition de DEAE-DEXTRAN (Pharmacia Fine Chemicals) à 100 µg/mL réussit souvent à favoriser l'apparition des plages de lyse cellulaire dans le cas des virus qui n'en produisent que difficilement.

4.5. TITRAGE PAR INTERFÉRENCE

Le virus de la rubéole peut être titré par effet cytopathique ou par la technique des plages. Cependant, comme toutes les souches ne sont pas cytopathogènes, l'application de ces techniques est difficile. On a cependant démontré que le virus de la rubéole bloquait la réplication des entérovirus dans les cellules qu'il infecte. On a tiré parti de cette observation et mis au point une technique de titrage par interférence sur cellules de rein de singe cercopithèque. Le virus de la rubéole ne cause aucun effet cytopathique sur ces cellules alors que le virus Echo–11 produit au contraire un effet cytopathique rapide.

1. Préparer une suspension de cellules de rein de cercopithèque à 200 000 cellules/mL dans un milieu de croissance.

2. Placer 100 µL de la suspension cellulaire dans chacune des cupules d'un plateau stérile.

3. Ajouter 50 µL de milieu de croissance.

4. Incuber à 37°C dans une étuve humidifiée à CO_2 pendant 24 h ou jusqu'à la formation d'un feuillet confluent.

5. Vidanger le milieu par inversion sur des gazes stériles.

6. Placer 50 µL de virus, dilué préalablement dans un milieu de maintien, dans des tubes, à l'intérieur de quatre cupules pour chaque dilution. Commencer l'ensemencement par la dilution la plus élevée afin de ne pas contaminer les dilutions.

7. Ajouter 50 µL de milieu de maintien.

8. Prévoir un virus témoin, c'est-à-dire le titrage d'un virus connu, conservé en petits volumes à –70°C. Prévoir aussi des cultures témoins.

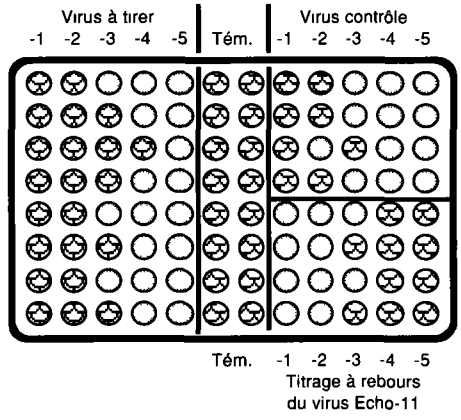
9. Incuber 7 jours à 37°C.

10. Ajouter 1 000 $DICT_{50}$ de virus Echo–11 dans 25 µL de milieu de maintien. Ces 1 000 doses supposent un titrage préalable du virus et sa répartition en petits volumes après une dilution convenable (c'est-à-dire après la congélation à un titre permettant une dilution de 1/25 à 1/50 avant usage).

11. Incuber 3 jours à 37°C.

12. Déterminer le nombre de cupules montrant un effet cytopathique et celles qui ont été protégées. Les cupules ne montrant aucun effet cytopathique sont celles qui contiennent le virus de la rubéole: elles ont été "protégées" de l'infection par le virus Echo–11. Pour la détermination du titre du virus de la rubéole par la formule de Kärber, **on retiendra donc le nombre de cultures protégées**.

13. Déterminer le titre viral en appliquant la formule de Kärber aux résultats (voir la section sur la détermination de la $DICT_{50}$).



Résultats

Virus à titrer: $10^{3.25}/0.025$ mL

Virus contrôle: $10^{2.5}/0.025$ mL

Virus Echo-11: $10^{3.0}/0.025$ mL

4.6. ÉPREUVE DE NEUTRALISATION DE L'INFECTIVITÉ

Cette épreuve est spécifique en ce sens qu'elle permet d'identifier un virus si l'on possède des antisérums mono-spécifiques, c'est-à-dire dirigés contre un seul virus. Ainsi, un virus isolé à partir d'un prélèvement clinique pourra être identifié en utilisant une batterie d'antisérums mono-spécifiques. La neutralisation de l'effet cytopathique par l'un des sérums indiquera l'identité du virus.

1. Déterminer la $DICT_{50}$ du virus en microtechnique.

2. Dans des tubes stérilisés, bien mélanger 0.2 mL de virus à 100 $DICT_{50}$/25 µL et 0.2 mL d'antisérums à 20 unités/25 µL (l'unité étant la dernière dilution du sérum qui neutralise 100 $DICT_{50}$/25 µL du virus). On utilise généralement plusieurs antisérums (voir figure).

3. Incuber pendant 60 min à la température de la pièce. Prévoir un virus témoin incubé simultanément dans les mêmes conditions.

4. Dans quatre cupules, placer 25 µL du mélange sérum-virus, puis 50 µL de milieu de maintien.

5. Pour chaque dilution du virus, ensemencer 25 µL de virus dans quatre cupules puis compléter avec 100 µL de milieu de maintien.

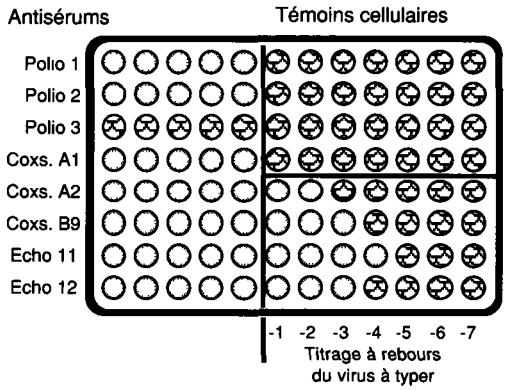
6. Prévoir deux cupules qui contiendront 25 µL des antisérums à 20 unités et 100 µL de milieu de maintien de même que des cupules ne contenant que des cellules et du milieu.

7. Lire l'effet cytopathique à tous les 2 jours pendant 8 jours.

8. Vérifier le nombre de doses de virus, les cellules témoins et les témoins sérums.

9. Déterminer quel antisérum a inhibé la multiplication du virus (dans

l'exemple suivant, le virus est un poliovirus de type 3).



4.7. PRÉPARATION DE MÉLANGES D'ANTISÉRUMS

Le coût et le temps nécessaires au typage de chaque nouveau virus par des sérums mono-spécifiques ne permettent pas d'employer la technique régulière. On utilise alors des mélanges de sérums.

1. Obtenir des antisérums mono-spécifiques ayant des titres très élevés (plus de 1000 unités/0.1 mL d'antisérum). Chaque sérum ne doit pas occuper plus de 10% d'un mélange.

2. Titrer individuellement chaque sérum contre 100 $DICT_{50}$/0.1 mL de virus. Le titre est exprimé en unités d'anticorps/0.1 mL: une unité étant la dernière dilution du sérum qui protège contre 100 $DICT_{50}$ de virus/ 0.1 mL.

3. Chaque mélange doit contenir 20 unités d'anticorps/0.1 mL. On doit diviser par 20 la dilution contenant une unité. Ex.: si la dilution 1:640 contient 1 unité/ 0.1 mL de sérum. Donc, 640/20 = 32 et la dilution 1:32 contient 20 unités/ 0.1 mL.

4. Incorporer les sérums individuels dans le mélange.

   Ex.: Mélange des sérums anti-poliovirus sérotypes 1, 2 et 3:

   Antisérums:

anti-polio 1	1: 5120/0.1 mL
anti-polio 2	1: 20480/0.1 mL
anti-polio 3	1: 10240/0.1 mL

   Pour obtenir 20 unités d'anticorps il faut diluer:

Polio 1	5120 ÷ 20	= 1: 256
Polio 2	20480 ÷ 20	= 1: 1024
Polio 3	10240 ÷ 20	= 1: 512

5. Déterminer le volume du mélange.

   Diviser le volume requis par la dilution contenant 20 unités d'anticorps.

   Ainsi pour 1 litre d'antisérum:

Polio 1:	1000 ÷ 256	3.90 mL
Polio 2:	1000 ÷ 1054	0.98 mL
Polio 3:	1000 ÷ 512	1.95 mL
	TOTAL	**6.83 mL**

   Donc, le mélange contiendra, dans 1 litre de milieu de maintien:

   3.90 mL d'antisérum Polio 1
   0.98 mL d'antisérum Polio 2
   1.95 mL d'antisérum Polio 3

6. Répartir en petits volumes et congeler à –20°C.

Évaluation du nombre de doses au cours d'un titrage à rebours d'un virus

Nombre de cupules (tubes) montrant un effet cytopathique à la dilution				
Pur	1:10	1:100	1:1000	Doses
4	4	4	3	2000
4	4	4	2	1000
4	4	4	1	500
4	4	4	0	300
4	4	3	0	200
4	4	2	0	100
4	4	1	0	50
4	3	2	0	50
4	3	1	0	30
4	3	0	0	20
4	2	2	0	30
4	2	1	0	20
4	2	0	0	10
4	1	0	0	5
4	0	0	0	3

Nombres correspondant aux log_2

Log_2	Nombre	Log_2	Nombre
1	2	21	2 097 152
2	4	22	4 194 304
3	8	23	8 388 608
4	16	24	16 777 216
5	32	25	33 554 432
6	64	26	67 108 864
7	128	27	134 217 728
8	256	28	268 435 456
9	512	29	536 870 912
10	1 024	30	1 073 741 824
11	2 048	31	2 147 483 648
12	4 096	32	4 294 967 296
13	8 192	33	8 589 934 592
14	16 384	34	17 179 869 184
15	32 768	35	34 359 738 368
16	65 536	36	68 719 476 736
17	131 072	37	137 438 953 472
18	262 144	38	274 877 906 944
19	524 288	39	549 755 813 888
20	1 048 576	40	1 099 511 627 776

Liste des log_2 de 1 à 25 et des nombres correspondants

Log_2	Nombre	Log_2	Nombre
1.00	2.0	10.00	1 024
1.25	2.4	10.25	1 218
1.50	2.8	10.50	1 448
1.75	3.4	10.75	1 722
2.00	4.0	11.00	2 048
2.25	4.8	11.25	2 435
2.50	5.7	11.50	2 896
2.75	6.7	11.75	3 444
3.00	8.0	12.00	4 096
3.25	9.5	12.25	4 871
3.50	11	12.50	5 793
3.75	13	12.75	6 889
4.00	16	13.00	8 192
4.25	19	13.25	9 742
4.50	23	13.50	11 585
4.75	27	13.75	13 777
5.00	32	14.00	16 384
5.25	38	14.25	19 484
5.50	45	14.50	23 170
5.75	54	14.75	27 554
6.00	64	15.00	32 768
6.25	76	16.00	65 536
6.50	91	17.00	131 072
6.75	108	18.00	262 144
7.00	128	19.00	524 288
7.25	152	20.00	1 048 576
7.50	181	21.00	2 097 152
7.75	215	22.00	4 194 304
8.00	256	23.00	8 388 608
8.25	304	24.00	16 777 216
8.50	362	25.00	33 554 432
8.75	431		
9.00	512		
9.25	609		
9.50	724		
9.75	861		

Log_{10} et antilog des nombres de 1 à 10

Nombre	Log_{10}	$Antilog_{10}$	Nombre
1.0	0.000	0.00	1.000
1.5	0.176	0.05	1.122
2.0	0.301	0.10	1.259
2.5	0.398	0.15	1.413
3.0	0.477	0.20	1.585
3.5	0.544	0.25	1.778
4.0	0.602	0.30	1.995
4.5	0.653	0.35	2.239
5.0	0.699	0.40	2.512
5.5	0.740	0.45	2.818
6.0	0.778	0.50	3.162
6.5	0.813	0.55	3.548
7.0	0.845	0.60	3.981
7.5	0.875	0.65	4.467
8.0	0.903	0.70	5.012
8.5	0.929	0.75	5.623
9.0	0.954	0.80	6.310
9.5	0.978	0.85	7.079
10.0	1.000	0.90	7.943
		0.95	8.913
		1.00	10.000

4.8. SENSIBILITÉ À L'ÉTHER

Cette épreuve permet d'identifier les virus enveloppés qui seront inactivés par l'éther. En effet, l'enveloppe virale est dérivée des membranes cellulaires et contient une grande quantité de lipides; ceux-ci, extraits par l'éther, détruisent le potentiel infectieux du virus.

1. Ajouter 1.5 mL d'éther à 0.5 mL de la suspension virale à éprouver.

2. Agiter vigoureusement.

3. Laisser reposer 1-2 h à 20°C en agitant occasionnellement ou 18-25 h à 4°C.

4. Placer le mélange dans un vase de Petri (en verre car le plastique est attaqué par l'éther) et laisser l'éther s'évaporer.

5. Préparer des dilutions décimales de la suspension virale traitée et du même virus non traité.

6. Titrer les deux virus et comparer les titres obtenus (inclure à titre de témoins un virus résistant et un virus sensible à l'éther).

4.9. SENSIBILITÉ AU 5–IUDR

Les virus dont l'acide nucléique est l'ADN sont inhibés par le 5-iodo-désoxyuridine (5-IUDR), alors que les virus à ARN ne le sont généralement pas.

Solution de 5-IUDR

Dissoudre 17.7 mg de 5-IUDR dans 10 mL d'eau distillée, puis compléter à 100 mL avec du milieu de maintien. **Diluer 1:10 dans le milieu de culture avant usage.**

Méthode

1. Préparer des dilutions décimales du virus à éprouver. Préparer aussi des dilutions de poliovirus (ou un autre virus à ARN) et d'herpèsvirus (ou autre virus à ADN) dans du milieu de maintien.

2. Ensemencer sur cellules en tubes ou en plateau comme pour un titrage.

3. Placer le milieu de maintien contenant de l'IUDR, sur la moitié des cultures; sur l'autre moitié, utiliser du milieu normal.

4. Incuber puis noter les titres avant d'interpréter les résultats:

- le virus de la polio ne doit pas être affecté
- le virus de l'herpès doit être complètement inhibé
- si les contrôles sont adéquats, interpréter l'épreuve avec le virus inconnu.

4.10. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Le microscope électronique s'est révélé un instrument des plus utiles pour le diagnostic rapide de certaines maladies à virus. Le virus peut être visualisé directement à partir de matériel provenant de lésions cutanées ou de sécrétions ou, plus souvent, après un passage sur cultures cellulaires. L'immuno-électro-microscopie (IEM) permet non seulement d'observer les virus en faible quantité, mais aussi de les identifier à l'aide d'antisérums spécifiques. La préparation des échantillons pour la microscopie électronique et l'IEM est décrite dans le chapitre sur la microscopie électronique.

Les échantillons pourront être: selles, sécrétions, lavages de gorge, lésions cutanées, cultures cellulaires (cellules et surnageants), sérums.

4.11. ÉPREUVE DE TEMPÉRATURE

Cette méthode est surtout utilisée pour le virus *Herpes simplex*.

1. Préparer des dilutions décimales du virus (10^{-1} à 10^{-7}) dans du milieu de maintien (MEM-Earle, 2% SFV, antibiotiques).
2. Ensemencer 0.1 mL de chaque dilution dans quatre tubes ou flacons, contenant des cellules de rein de cercopithèque en culture primaire ou secondaire.
3. Ajouter 1.5 mL de milieu de maintien.
4. Incuber deux tubes de chaque dilution à 37°C et les deux autres tubes à 40°C.
5. Lire à tous les 2 jours pendant 7-8 jours.

NOTE: Prévoir un virus contrôle pour le type 1 et pour le type 2 à chaque température.

Interprétation

Le virus herpès simplex type 1 provoquera la dégénérescence des cultures à 40°C alors que le type 2 n'aura aucun effet.

4.12. INOCULATION AUX SOURICEAUX NOUVEAU-NÉS

Les souriceaux nouveau-nés sont très sensibles au virus coxsackie A et à certains Togavirus et peuvent donc servir à l'isolement de ceux-ci.

1. Inoculer 0.02 mL par voie intracérébrale (IC) et 0.05 mL par voie intrapéritonéale (IP). Utiliser une aiguille 26-3/8" et une seringue à tuberculine de 1 mL.
2. Deux fois par jour, à tous les jours, surveiller l'apparition de symptômes de maladie, de paralysie ou de mortalité. Faire l'histopathologie des animaux atteints.
3. Prélever les cerveaux ou les muscles des membres des animaux paralysés, morts ou malades pour examen histopathologique.

NOTES:

- S'il est nécessaire de préserver les tissus prélevés pour des études ultérieures, on doit les placer dans une solution de glycérine phosphatée (tampon phosphate 0.2 M pH 7.4 et glycérine en volumes égaux).
- Observer les animaux pendant 14 jours.
- Utiliser quatre souriceaux pour l'inoculation IC et quatre autres souriceaux pour l'inoculation IP.
- Effectuer une visite chaque jour non seulement pour vérifier l'état des animaux inoculés mais aussi la présence de nouveau-nés, car l'inoculation doit se faire dans les 24 h suivant la naissance.
- Ne pas toucher les souriceaux avec les doigts. Utiliser des gants ou des pinces pour éviter le cannibalisme.

Interprétation

La maladie ou la mort des souriceaux peut être causée par un agent infectieux ou par la toxicité de l'inoculum. Si la mort survient dans les 24 h après l'inoculation, diluer l'échantillon 1:10 et reprendre l'inoculation.

5. RÉFÉRENCE

Lennette, E.H., et Schmidt, N.J. 1979. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections.* American Public Health Association, Washington, DC, 575 pages.

4

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MODÈLES ANIMAUX

Gilles Lussier

1. INTRODUCTION

Les animaux de laboratoire ont énormément contribué à l'acquisition de nos connaissances dans le domaine de la virologie. Il est même permis de penser que la presque totalité des virus des mammifères que nous connaissons aujourd'hui a été inoculée aux animaux de laboratoire, en particulier à la souris. Les animaux demeurent encore importants en recherche biomédicale; leur production et leur utilisation sont maintenant considérées comme une science qui a recours à diverses disciplines afin de fournir à l'expérimentateur un matériel vivant qui lui assure des résultats valables et reproductibles.

Dans ce chapitre, il nous a semblé utile de rappeler l'importante contribution des rongeurs au domaine de la virologie et d'insister sur certains points importants pour assurer leur utilisation rationnelle et profitable.

2. PRINCIPALES ESPÈCES

2.1. SOURIS

L'utilisation de la souris en virologie expérimentale remonte à la fin des années 1920. Dès ce moment, on s'est également intéressé aux infections naturelles de la souris à la suite de l'isolement des virus de l'ectromélie, de la poliomyélite et de la chorio-méningite lymphocytaire. Ces infections naturelles furent alors utilisées comme modèles pour l'étude d'infections similaires chez l'homme et pour l'étude de l'interaction entre l'hôte et le virus. Si la seconde Grande Guerre a quelque peu ralenti les activités de recherche, elle a toutefois mis en lumière la nécessité de développer des moyens efficaces de prévention des infections virales pour les forces armées ce qui stimula à nouveau les recherches en virologie et l'utilisation de la souris comme animal d'expérience.

La première utilisation expérimentale de la souris en virologie semble remonter à 1908 alors que Remlinger nota sa suscep-

tibilité au virus de la rage. Peu de temps après, on se rendit compte que le virus herpès simplex et celui de la vaccine étaient également pathogènes. Cependant le réel point de départ de l'utilisation de la souris remonte à l'observation de Theiler relativement à sa susceptibilité pour le virus de la fièvre jaune. Theiler démontra qu'il était en effet possible de quantifier la présence du virus avec beaucoup de précision en procédant à la dilution du matériel infectieux et à son inoculation par voie intracérébrale. Par la suite, des collègues de Theiler mirent au point une épreuve de protection qui fut abondamment utilisée dans les études séro-épidémiologiques impliquant l'inoculation intra-péritonéale d'un mélange virus-sérum. Les recherches sur la fièvre jaune conduisirent également à l'identification de plusieurs autres virus ce qui encouragea la mise sur pied, à l'échelle mondiale, d'un vaste programme de recherche sur les arbovirus essentiellement basé sur l'utilisation de la souris. Aujourd'hui encore, en dépit des progrès réalisés dans le domaine de la culture cellulaire, plusieurs arbovirologistes considèrent que la souris demeure essentielle pour l'isolement de nouveaux virus.

C'est également au cours des recherches sur la classification des arbovirus que les scientifiques de la Fondation Rockefeller découvrirent la présence de virus propres à la souris et qui s'avéraient responsables de perturbations des résultats expérimentaux. Le premier de ces virus à être identifié fut celui de l'encéphalomyélite et dès 1937 Burnet et Freeman mirent en garde les virologistes en les prévenant que "*dans toute recherche de virus nécessitant plus d'un passage chez l'animal, ils devaient toujours garder à l'esprit la possibilité d'isoler un virus latent chez l'animal qui pourrait s'ajouter à celui qu'ils recherchent ou qui pourrait parfois même s'y substituer*". A cette même époque, Andrews *et al.* (1934) démontrèrent que la souris était susceptible au virus de l'influenza lorsqu'il était administré par voie intranasale. Cette observation fut l'amorce de recherches qui se poursuivent encore aujourd'hui visant à mieux comprendre la pathogénie de l'infection et les moyens de défense de l'organisme. En 1948, une découverte fortuite effectuée par Dalldorf et Sickles conduisit à l'identification, grâce à la souris, de dizaines de nouveaux virus. Ces virologistes identifièrent un virus pathogène pour le souriceau nouveau-né présent dans les matières fécales d'enfants de la ville de Coxsackie dans l'état de New York atteints d'une forme atypique de "poliomyélite".

La souris devint également l'animal de choix en immunologie expérimentale lorsqu'en 1951 Medawar *et al.* rapportèrent que le rejet de greffe pouvait être prévenu grâce à l'inoculation préalable de cellules lymphoïdes provenant d'animaux de la même souche que celle d'où originait le greffon. Dix ans plus tard, Miller démontra l'importance du thymus dans la réponse immune à la suite de ses expériences sur la thymectomie. Parallèlement à ces études dans le domaine de l'immunologie, la souris continua à être fortement utile pour l'étude de la pathogénie des infections virales et pour la compréhension des mécanismes de défense des infections virales tant naturelles qu'expérimentales.

2.2. RAT

L'utilisation du rat a suivi une voie quelque peu différente de celle de la souris et remonte en 1906 avec les travaux de Donaldson de l'Institut Wistar de Philadelphie. Partant de l'observation que le rat est omnivore et que son système nerveux se développe comme celui de l'homme mais à un rythme plus rapide, Donaldson conclut que cet animal pour-

rait être avantageusement utilisé dans des études portant sur la nutrition et sur le fonctionnement du système nerveux. Avec la création quelques années plus tard de la première souche consanguine, le rat fut abondamment utilisé en endocrinologie, en physiologie de la reproduction, en cancérologie et en génétique. Cependant son utilisation en microbiologie et plus particulièrement en virologie ne fut toujours que relativement très marginale.

2.3. COBAYE

En dépit de sa grande susceptibilité au bacille de la tuberculose et à de nombreuses rickettsies, le cobaye n'a pas non plus été très utilisé en virologie, si ce n'est pour la production d'anticorps. Plus récemment toutefois deux de ses infections naturelles, l'infection à cytomégalovirus et la leucémie, ont été avantageusement utilisées en pathologie virale comparée comme modèle pour l'étude des infections humaines (Hsiung *et al.* 1986).

2.4. HAMSTER

Tous les hamsters dorés (*Meriones unguiculatus*) utilisés aujourd'hui en recherche biologique sont les descendants de huit hamsters capturés en Syrie en 1930. Le hamster devint très vite l'animal préféré dans plusieurs types de recherche en raison de sa susceptibilité à plusieurs infections virales expérimentales mais surtout en raison du fait qu'il est relativement exempt d'infections naturelles. Le hamster a été utilisé comme modèle animal dans l'étude de la pathogénie d'un grand nombre d'infections virales; c'est cependant pour la recherche du pouvoir oncogène des virus des mammifères qu'il fut particulièrement utile (Merkow et Slifkin 1973).

3. FACTEURS INFLUENÇANT LE CHOIX ET L'UTILISATION

3.1. FACTEURS RELIÉS À L'HÔTE

Avec l'avènement des cultures cellulaires, l'animal de laboratoire est moins utilisé que par le passé, il demeure cependant toujours un outil de recherche fort utile. Toutefois pour en retirer tous les avantages possibles, l'expérimentateur doit tenir compte de certains facteurs susceptibles de modifier la réponse de l'animal.

Dans cette section, nous nous bornerons à effectuer un survol des facteurs reliés soit à l'hôte, soit au virus susceptibles d'influencer considérablement les résultats de la recherche. Les facteurs reliés à l'hôte ont particulièrement trait au génotype, à l'âge, au sexe, à l'environnement et à la flore microbienne, tandis que les facteurs reliés au virus ont trait à la virulence, à la dose et aux voies d'inoculation.

3.1.1. Génotype

En raison de leur coût moins élevé, les animaux de lignées non consanguines ont été utilisées pendant plusieurs décennies en recherche virologique; ils demeurent encore très utiles dans les laboratoires de diagnostic et de contrôle. Toutefois de nombreuses souches consanguines sont maintenant disponibles; en plus d'être histocompatibles, ces souches ont l'avantage de posséder un patrimoine génétique défini permettant l'obtention de résultats expérimentaux constants et reproductibles. Le choix de la souche utilisée doit donc être effectué en fonction des objectifs poursuivis. Les variations de la susceptibilité et de la résistance aux infections virales naturelles ou expérimentales de diverses souches animales sont impor-

tantes et ont déjà fait l'objet d'une revue de question (Bang 1978).

3.1.2. Age

Les jeunes, particulièrement avant le sevrage, sont généralement plus sensibles que les adultes à l'inoculation d'une même dose de virus. Le développement de la résistance varie suivant la virulence et la dose du virus. Cette résistance est plus manifeste à la suite de l'administration du virus par voie périphérique plutôt que par voie intracérébrale; la première méthode déclenche plus facilement la mise en branle des moyens de défense de l'hôte. Ainsi chez l'adulte, l'administration d'un virus par voie intracérébrale peut être mortelle alors que l'administration du même virus par voie périphérique pourrait être tout à fait asymptomatique. Par contre la compétence immunologique peut diminuer chez les animaux âgés et leur susceptibilité à l'infection peut ainsi augmenter.

Cette résistance reliée à l'âge peut modifier plusieurs paramètres visibles de l'infection tels que la période d'incubation, le pourcentage de survie, la gravité des signes cliniques, la sévérité et l'étendue des lésions et le nombre de voies par lesquelles l'animal peut être infecté. Ainsi chez la femelle en gestation, l'inoculation d'un virus directement dans la cavité utérine peut induire des lésions. Cependant au cours d'une infection naturelle la susceptibilité du fœtus varie suivant la capacité que possède le virus de traverser la barrière placentaire et suivant le stade de la grossesse au moment de l'infection. Les mécanismes impliqués dans la résistance en fonction de l'âge ne sont pas complètement élucidés, on sait cependant que le développement du système immunologique y joue un rôle-clé et que la maturation des cellules du système lympho-réticulaire apparaît essentielle (Sigel 1952, Skamene *et al.* 1980).

3.1.3. Sexe

Plusieurs travaux ont démontré que le sexe de l'animal peut faire varier la réponse à une infection virale. Ainsi, les souris mâles de plusieurs souches consanguines sont plus sensibles que les femelles au développement d'une hyperglycémie consécutive à une infection par le virus de l'encéphalomyocardite (Boucher *et al.* 1975). La castration augmente la résistance des mâles face au même virus. La gestation peut aussi influencer sur la susceptibilité à certaines infections. Pour expliquer ce phénomène, on a émis l'hypothèse que cette susceptibilité accrue serait reliée à une diminution de l'immunité cellulaire (St. Hill *et al.* 1973). Il est donc prudent de tenir compte de ce facteur dans la planification d'une expérimentation.

3.1.4. Statut microbiologique

La présence d'infections non apparentes chez les animaux utilisés peut avoir des conséquences fâcheuses sur les résultats de l'expérimentation animale et être la cause de pertes de temps et d'argent fort considérables (Bhatt *et al.* 1986). Dans les conditions que l'on peut qualifier de normales, l'hôte et le microbe sont généralement dans un état d'équilibre; cependant cet équilibre peut être rompu lorsque l'animal est soumis à l'action de facteurs d'agression où l'on assiste à une diminution de ses moyens de défense. Il suffit souvent de conditions ne présentant aucun caractère exceptionnel pour révéler une infection non apparente et déclencher l'apparition de graves épizooties. Ainsi les variations dans les conditions climatiques tels que le changement de température et d'humidité, le transport, l'adapta-

tion à un nouveau milieu ou à un nouveau régime, une intervention chirurgicale, l'administration de substances immunosuppressives peuvent déclencher la transformation d'une infection latente en une infection déclarée.

Les infections non apparentes peuvent également modifier la réponse immunitaire de l'animal. Ainsi une infection de la souris par le virus de la choriométingite lymphocytaire inhibe les réponses humorale et cellulaire (Mims et Wainwright 1968), induit la production d'interféron (Ronco *et al.* 1981) et stimule l'activité des cellules NK et des macrophages (Welsh 1978, Blanden et Mims 1973). De même l'infection par le cytomégalovirus est associée à une suppression dramatique de la réponse immunologique chez la souris et le rat. Par contre, une infection latente par le virus de la déshydrogénase lactique s'accompagne d'une augmentation de la réponse immunologique humorale et d'une suppression transitoire de la réponse immunologique cellulaire. De très nombreux exemples de perturbations de la réponse de l'animal sont rapportés dans la littérature scientifique (Bhatt *et al.* 1986). Les infections latentes sont également importantes à cause des erreurs d'interprétation qu'elles peuvent provoquer. Ainsi les lésions pulmonaires consécutives à une infection par le virus Sendai ont déjà été décrites comme étant des lésions néoplasiques.

L'importance de certaines infections est grande en raison des dangers possibles de transmission à l'homme soit directement, soit par l'intermédiaire des tissus, des sérums ou des vaccins obtenus de ces animaux infectés; c'est notamment le cas de la chorio-méningite lymphocytaire et de l'infection par le virus Hantaan (Bowen *et al.* 1975, Lussier et Descôteaux 1986).

L'entretien et la manipulation des animaux en cours d'expérimentation ne doivent pas non plus contribuer à la diffusion des infections mais doivent plutôt viser à en restreindre la propagation. Pour ce faire, la stérilisation de la nourriture, de l'eau et de la litière est souvent recommandable. D'autre part, l'utilisation d'animaux dont la flore microbienne est connue (i.e. animaux exempts de pathogènes spécifiques ou d'animaux gnotobiotiques) réduit l'importance des infections intercurrentes. Il n'est pas non plus recommandé de loger les animaux d'espèces différentes dans les mêmes locaux, pas plus que d'y loger des animaux de même espèce mais provenant d'élevages différents. Les humains peuvent également être la source de certaines infections; l'utilisation de masques, de gants, de vêtements à usage unique, de même que la désinfection de la peau contribuent à réduire ce risque. La restriction de la circulation dans l'animalerie réduit également les risques de transmission des infections, tout comme le fait l'utilisation de filtres sur les cages. L'équipement nécessaire au lavage et à la stérilisation des cages et à l'incinération du matériel contaminé et des animaux morts devrait être disponible à proximité des locaux où sont gardés les animaux (Wedum 1974, Pike 1976).

L'état sanitaire des animaux gardés en colonie devrait être déterminé à intervalles réguliers au moyen d'épreuves sérologiques appropriées (Smith 1984). Les animaux obtenus de l'extérieur et dont on ne connaît pas l'état sanitaire devraient être gardés en quarantaine et leur état évalué avant leur utilisation ou leur intégration dans des pièces où sont déjà logés d'autres animaux. L'ajout de quelques animaux de plus que le nombre nécessaire à l'expérimentation permet de

procéder à des examens réguliers pour déceler l'apparition d'infections latentes. À cette fin, on peut également utiliser des animaux gnotobiotiques ou exempts d'organismes pathogènes spécifiques placés dans des endroits stratégiques de l'animalerie. En plus des examens sérologiques réguliers, la présence d'infections devrait également être recherchée par un examen macroscopique et microscopique des tissus prélevés lors de la nécropsie.

3.1.5. Environnement physique

L'environnement peut également influencer les résultats expérimentaux; cette influence est cependant difficile à évaluer de façon précise. Par exemple, la contamination de la nourriture peut faire varier la susceptibilité de l'animal aux infections virales. Les cycles de lumière et d'obscurité, le bruit, la qualité de l'air, la présence d'odeurs, d'insecticides, de désinfectants volatiles et d'ammoniaque, les changements de cages sont aussi des facteurs importants de variation (Pakes *et al.* 1984). Dans la mesure du possible ces facteurs doivent être standardisés (Friedman *et al.* 1967, Lussier 1986). Il a été démontré, par exemple, que les variations de la température ambiante peuvent augmenter ou diminuer la résistance de l'animal. Ainsi, les souris infectées par le virus de la rage et gardées dans des locaux où la température est élevée au cours d'une infection sont plus résistantes que les souris gardées à la température normale.

3.2. FACTEURS RELIÉS À L'AGENT

Les facteurs reliés à l'agent et influençant la réponse de l'animal à une infection virale peuvent dépendre de la virulence, de la dose et de la voie d'inoculation des virus.

3.2.1. Virulence

La virulence d'un virus chez un animal inoculé expérimentalement peut s'exprimer de manières diverses. Généralement la façon la plus facile de le faire est par l'observation de lésions et de signes cliniques. La virulence est alors évaluée par l'inoculation de groupes d'animaux avec des dilutions sériées du virus et par la mesure de la réponse déterminée soit par l'apparition de signes cliniques ou de lésions, soit par la recherche de virus ou par l'utilisation d'épreuves sérologiques. La virulence peut également être déterminée par l'observation de lésions macroscopiques ou microscopiques dans un tissu ou un organe donné. La virulence peut enfin dépendre de modifications apportées au virus; ainsi elle peut être diminuée par une inactivation chimique ou par la sélection de mutants non virulents.

La virulence peut aussi être reliée à la souche du virus utilisée; elle doit être évaluée en tenant compte des facteurs reliés à l'hôte ainsi que des facteurs susceptibles de la modifier tels que la dose, la voie d'inoculation et le nombre de passages chez l'animal. Le pouvoir pathogène d'un virus pour un hôte donné est généralement proportionnel à la concentration de virus inoculé. Un virus est généralement plus virulent lorsqu'il est administré par voie intracérébrale, comparativement à une inoculation par voie parentérale.

La virulence d'un virus peut être altérée de diverses façons. Ainsi, le passage d'un virus en culture cellulaire peut diminuer sa virulence. Le tropisme pour certains organes peut également être modifié par passages sériés. Ainsi, le virus grippal peut acquérir une affinité pour le foie et produire des lésions hépatiques à la suite de passages répétés chez la souris. Le tro-

pisme d'un virus pour un organe donné, tout comme l'intensité et la distribution des lésions produites, peuvent donc varier en fonction du nombre de passages effectués.

3.2.2. Dose

La pathogénie d'une infection expérimentale est souvent reliée à la dose de virus administrée. Une forte dose non seulement provoque-t-elle une plus forte morbidité et une plus grande mortalité mais elle diminue également le temps de survie et provoque plus rapidement l'apparition de lésions qui sont généralement plus graves que chez les animaux ne recevant qu'une plus faible dose.

3.2.3. Voie d'inoculation

L'importance de la voie d'inoculation dans la production d'une infection virale expérimentale a été constatée depuis très longtemps. Par exemple, une inoculation par voie intracérébrale provoque un traumatisme sévère alors qu'une inoculation par les autres voies est sujette à l'influence des facteurs pouvant faire varier la résistance ou la susceptibilité de l'hôte.

3.2.3.1. Voie intracérébrale

Le fait que certains virus soient faiblement pathogènes après une inoculation par les voies périphériques mais qu'ils se montrent très virulents lorsqu'administrés par voie intracérébrale démontre la sensibilité de cette voie. L'inoculation d'un virus directement dans le cerveau évite les mécanismes de défense naturelle de l'organisme, y compris la barrière sang-cerveau et élimine la nécessité d'une réplication virale en dehors du système nerveux central avant l'envahissement de celui-ci. On sait que la pression lors d'une inoculation par voie intracérébrale est d'à peu près trente fois plus forte que celle exercée par le liquide céphalo-rachidien. La rupture de l'arachnoïde par suite de cette augmentation de la pression, le dépôt du virus le long du trajet de l'aiguille et la rupture des vaisseaux capillaires sont autant de facteurs qui contribuent à la dissémination du virus. Comme l'inoculation intracérébrale provoque d'importantes lésions traumatiques, elle peut entraîner des mortalités soudaines. D'autre part, il est plus facile d'inoculer de jeunes animaux que des adultes par voie intracérébrale puisque la boîte crânienne n'est alors pas encore complètement calcifiée. Les adultes devraient donc préférablement être inoculés par d'autres voies. La voie cérébrale n'est pas non plus normalement empruntée par les virus au cours des infections naturelles; son utilisation pour déterminer la pathogénie d'une infection virale rend alors l'interprétation beaucoup plus difficile. L'inoculation par la voie intracérébrale peut également provoquer des séquelles graves comme par exemple le blocage de l'aqueduc de Sylvius et le développement subséquent d'une hydrocéphalie.

3.2.3.2. Voies périphériques

3.2.3.2.1. Voie respiratoire

L'administration par la voie respiratoire ressemble à celle que prennent plusieurs virus au cours d'infections naturelles. L'inoculum peut être placé soit à l'embouchure des narines d'où il est inhalé ou soit administré par aérosols. La première méthode favorise le dépôt du virus au niveau des voies respiratoires supérieures bien que l'infection puisse également se rendre jusqu'aux poumons. C'est une méthode d'administration rapide et économique par laquelle il est malheureusement difficile de quantifier exactement la dose administrée. Une anesthésie prélable facilite la pénétration

de l'inoculum dans les cavités nasales. Il est cependant bon de se rappeler que certains gaz anesthésiques comme l'éther peuvent inactiver des virus sensibles aux solvants lipidiques. L'administration par aérosols est généralement effectuée dans des chambres spécialement conçues à cet effet; elle a le désavantage d'être dispendieuse mais a l'avantage de pouvoir mieux contrôler la dose et l'uniformité du matériel infectieux administré.

Le devenir de l'inoculum administré par la voie respiratoire dépend du tropisme de l'agent. Une virémie peut survenir après la réplication du virus au niveau des voies respiratoires supérieures et inférieures. Les virus neurotropes peuvent gagner le cerveau après avoir envahi la muqueuse olfactive en suivant le trajet des fibres nerveuses inervant la muqueuse nasale. L'infection peut être transmise aux autres animaux par les aérosols et par les particules contaminées en suspension dans l'air. Tous les facteurs externes et les conditions environnementales pouvant faciliter ou minimiser ces effets doivent donc être considérés lors de la planification d'une expérience.

3.2.3.2.2. Voie orale

C'est la voie de choix pour l'administration des virus entériques; cette voie est également utilisée pour l'administration de plusieurs autres virus. Les virus peuvent être incorporés à la nourriture, introduits dans la bouche ou administrés directement dans l'estomac au moyen d'une sonde. Le fait de retirer l'eau et la litière avant et après l'administration offre la possibilité d'obtenir des conditions plus reproductibles. A la suite d'une administration par la voie orale, le virus peut également parvenir au niveau de l'appareil respiratoire à cause des communications anatomiques entre le rhinopharynx et l'oropharynx. Le degré de maturation des cellules de la muqueuse intestinale et des cellules lymphoïdes de l'intestin influencent le devenir de l'agent administré. Par exemple, la muqueuse intestinale des souriceaux nouveau-nés ne protège pas efficacement contre un envahissement viral.

3.2.3.2.3. Voie intraveineuse

L'administration par voie intraveineuse assure presque instantanément une grande diffusion du matériel inoculé. La localisation du virus administré par cette voie dépend de son tropisme; cependant le système réticulo-endothélial joue un rôle important de défense en raison de sa capacité à débarrasser le sang des substances étrangères. Les virus possédant la capacité de s'adsorber ou de se répliquer dans les cellules réticulo-endothéliales ou hématopoïétiques peuvent cependant éviter cette ligne de défense.

3.2.3.2.4. Voie intrapéritonéale

C'est une voie facile d'accès chez les rongeurs permettant une inoculation rapide et bien quantifiable. Les virus introduits dans la cavité péritonéale peuvent se répliquer au niveau des cellules mésothéliales mais ils sont rapidement absorbés dans la circulation. L'utilisation de la voie intrapéritonéale pour l'étude de la transmission d'une infection virale chez la femelle en gestation doit cependant être faite avec précautions puisque les virus peuvent accidentellement être introduits au niveau du système génito-urinaire.

3.2.3.2.5. Voies sous-cutanée et intradermique

L'inoculation dans ou sous la peau s'apparente à une transmission naturelle par morsure ou par piqûre. Bien que le virus puisse être acheminé au niveau des gan-

glions mésentériques régionaux par la voie lymphatique, il est aussi fréquemment acheminé par les capillaires vers la circulation sanguine. L'inoculation intradermique ou dans le coussinet plantaire est utile pour l'étude de la pathogénie d'un agent qui envahit l'organisme par le système nerveux périphérique comme, par exemple, l'herpesvirus ou le virus rabique.

3.2.3.2.6. Voie intra-utérine

L'inoculation par la voie intra-vaginale a été utilisée pour le développement de modèles pour l'étude des infections génitales humaines à herpèsvirus type 2. Le virus est introduit au moyen d'un écouvillon et les souris mâles placées au contact des femelles infectées peuvent développer des lésions herpétiques au niveau du pénis. Chez la femelle en gestation, les résultats d'une infection effectuée à travers la paroi utérine varient cependant en fonction du stade de gestation. L'inoculation par voie intra-utérine ne constitue cependant pas un bon modèle pour l'étude de la transmission verticale des infections virales.

4. SIGNES VISIBLES

Au moins quatre moyens peuvent être utilisés pour reconnaître la présence d'une infection virale naturelle ou expérimentale; ce sont les signes cliniques, les lésions, la réponse immune et l'isolement de l'agent. Les méthodes utilisées pour leur mise en évidence peuvent varier suivant les objectifs de l'expérimentation et les possibilités de l'expérimentateur.

4.1. SYMPTÔMES CLINIQUES

L'observation des signes cliniques est un indicateur très grossier de la présence d'une infection virale. Les symptômes ne sont généralement pas très spécifiques puisque l'animal ne réagit que d'une façon très limitée; d'où la nécessité de procéder parfois à des prélèvements de tissus ou de sérum pour y effectuer des analyses plus approfondies. L'intensité des symptômes associés à une infection virale varie: certains peuvent être facilement décelés, telle la mortalité, d'autres, au contraire, peuvent être très subtiles et passer inaperçus. Chez les rongeurs, l'animal malade apparaît dans un état léthargique, ramassé en boule, le dos voûté, le poil hérissé et l'abdomen rétracté. Les animaux atteints de lésions nerveuses ont une perte de réflexes et adoptent une posture et/ou une démarche anormales. Une affection de l'appareil digestif se traduit par de l'anorexie, de la déshydratation et de la diarrhée. Les infections de l'appareil respiratoire sont généralement accompagnées de dyspnée et parfois de jetage nasal. Les infections des voies génitales se traduisent par une baisse de la fécondité, la résorption des fœtus, une diminution du nombre de petits par portée et parfois par des anomalies congénitales.

La virulence du virus ou la susceptibilité de l'hôte sont fréquemment exprimées en terme de mortalité. Une dose LD_{50} indique que 50% des animaux inoculés sont morts par suite d'une inoculation par une voie donnée, à un âge précisé et dans un laps de temps déterminé. Le temps de survie moyen, et comme corollaire le temps moyen de mortalité, précisent le cours de l'infection et peuvent être calculés de la façon suivante:

Calcul du temps moyen de mortalité (TMM)

$$\sum \frac{\text{Jour où les mortalités sont survenues} \times \text{Nombre de mortalités au cours de cette journée}}{\text{Nombre total de mortalités}}$$

Calcul du temps moyen de survie (TMS)

$$\sum \frac{\text{Nombre de journées de survie} \times \text{Nombre d'animaux qui n'ont pas survécu au-delà de cette journée}}{\text{Nombre total d'animaux inoculés}}$$

4.2. LÉSIONS

Les lésions peuvent être observées macroscopiquement ou à l'examen histologique. Dans ce dernier cas, les examens sont effectués sur des tissus fixés et préparés à cette fin. Pour assurer une meilleure préservation des détails morphologiques lors de la recherche d'inclusions virales caractéristiques d'une infection par certains groupes de virus, il est préférable d'utiliser le fixateur de Bouin. Les lésions virales se traduisent généralement par une réaction inflammatoire à cellules mononucléées et/ou une nécrose tissulaire. Les méthodes immunocytochimiques comme la fluorescence et l'immunoperoxydase sont fréquemment utilisées pour la mise en évidence de l'antigène. Pour l'immunofluorescence, il est préférable de procéder à la congélation des tissus dans l'azote liquide. L'immunoperoxydase peut être pratiquée sur les tissus fixés dans le formol.

4.3. ÉPREUVES SÉROLOGIQUES

La présence d'une infection virale dans une colonie d'animaux peut généralement être reconnue par la détection d'anticorps spécifiques. A cette fin, les méthodes classiques d'inhibition de l'hémagglutination, de la fixation du complément, de la neutralisation, de l'immunofluorescence et la technique ELISA peuvent être utilisées. Les réponses immunes primaires commencent généralement au cours de la première semaine suivant l'infection et atteignent leur maximum vers la troisième semaine. Pour les épreuves sérologiques, le sang entier sans addition d'agents de conservation est prélevé aseptiquement. Les précautions doivent être prises afin d'éviter l'hémolyse qui peut survenir par le passage forcé du sang dans une aiguille de petit calibre ou par son entreposage prolongé avant la séparation du sérum. Les sérums doivent être conservés à –20°C si les épreuves sérologiques ne peuvent être effectuées dans un court délai après le prélèvement.

4.4. ISOLEMENT VIRAL

L'isolement des virus a de meilleures chances d'être réussi lorsqu'il est pratiqué à partir de matériel frais prélevé aseptiquement ou à partir de tissus conservés à –60°C. On devrait éviter l'exposition des tissus aux produits chimiques tels les solvants organiques (les anesthésiques) qui peuvent inactiver les virus sensibles. Les tissus prélevés sont dilués dans un milieu approprié et inoculés sur cultures cellulaires qui démontrent généralement des changements caractéristiques en présence de virus. Cependant en raison des coûts élevés, l'isolement est plus rarement utilisé que la sérologie pour le diagnostic des infections chez les animaux de laboratoire.

5. RÉFÉRENCES

Andrewes, C.H., Laidlaw, P.P., et Smith, W. 1934. The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza. Lancet 2: 859-862.

Bang, F.B. 1978. Genetics of resistance of animals to viruses. I. Introduction and studies in mice. Adv. Virus Res. 23: 269-348.

Bhatt, P.N., Jacoby, R.O. Morse, H.C.III et New, A.E. (Éd.). 1986. *Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effects on Biomedical Research.* Academic Press, Inc. New York.

Blanden, R.V. et Mims, C.A. 1973. Macrophage activation in mice infected with ectromelia or lymphocytic choriomeningitis virus. Aust. J. Exp. Med. Sci. 51: 393-398.

Boucher, D.W., Hayashi, K., Rosenthal, J. et Notkins, A.L. 1975. Virus-induced diabetes mellitus. III. Influence of the sex and strain of the host. J. Infect. Dis. 131: 462-466.

Bowen, G.S., Calisher, C.H., Winkler, W.G., Kraus, A.L., Fowler, E.H., Garman, R.H., Fraser, D.W. et Hinman, A.R. 1975. Laboratory studies of a lymphocytic choriomeningitis virus outbreak in man and laboratory animals. Amer. J. Epidemiol. 102: 233-240.

Burnet, F.M. et Freeman, M. 1937. Experimental studies on the virus of "Q" fever. Med. J. Aust. 2: 218-299.

Dalldorf, G. et Sickles, G.M. 1948. An unidentified, filtrable agent isolated from the feces of children with paralysis. Science 108: 61-62.

Friedman, J.-C., Mahouy, G. et Sabourdy, M. 1967. Réflexions sur l'organisation de l'élevage des animaux de laboratoire et de l'expérimentation animale. Rec. Méd. Vet. 143: 879-887.

Greenwood, M., Hill, A.B. Topley, W. W. C. et Wilson, J. 1936. Experimental epidemiology. Med. Res. Counc. St. Brit. Spec. Rep. Ser. No. 209.

Guillon, J.-C. 1986. Virus murins: Implications en élevage et en expérimentation. Sci. Tech. Anim. Lab. 11: 187-194.

Hsiung, G.-D., Griffith, B.P. et Bia, F.J. 1986. Herpesviruses and retroviruses of guinea pigs. In *Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effects on Biomedical Research.* P.N. Bhatt, R.O. Jacoby, A.C. Morse III et A.E. New (Edit.) Academic Press, New York, pages 451-504.

Lussier, G. 1986. La gestion sanitaire des élevages de rongeurs utilisés en recherche biomédicale. Rev. Vét. Can. 27: 59-69.

Lussier, G. et Descôteaux, J.-P. 1986. La fièvre hémorragique avec syndrome rénal. Une zoonose à surveiller. Union Méd. Can. 115: 303-304.

Merkow, L.P. et Slifkin, M. 1973. Oncogenic adenoviruses. Prog. Exp. Tumor Res. 18: 1-293.

Mims, C.A. et Wainwright, S. 1968. The immunodepressive action of lymphocytic choriomeningitis virus in mice. J. Immunol. 101: 717-724.

Morse, H.C. 1981. The laboratory mouse - a historical perspective. *The Mouse in Biomedical Research.* Foster, H.L. Small, J.D. et Fox, J.G (Edit.). Volume 1 Academic Press, New York, pages 1-16.

Pakes, S.P., Lu, Y.-S. et Meunier, P.C. 1984. Factors that complicate animal research. *Laboratory Animal Medicine.* J.G. Fox, B.J. Cohen et F.M. Loew édit. Academic Press, Inc. New York, pages 649-665.

Remlinger, P. 1908. Transmission de la rage à la souris par ingestion. C. R. Soc. Biol., Paris 65: 385-386.

Ronco, P., Rivière, Y., Thoua, Y., Bandu, M.T., Guillon, J.C., Verroust, P. et Morel-Maroger, L. 1981. Lymphocytic choriomeningitis in the nude mice. An immunological study. Immunology 43: 763-770.

Sawer, W.A. et Lloyd, W. 1930. The use of mice in tests of immunity against yellow fever. J. Exp. Med. 54: 533-555.

Sigel, M.M. 1952. Influence of age on susceptibility to virus infection with particular reference to laboratory animals. Ann. Rev. Microbiol. 6: 247-280.

Skamene, E., Kongshavn, P.A.L. and Landy, M. (Edit.) 1980. *Genetic Control of Natural Resistance to Infection and Malignancy*. Academic Press, New York.

Smith, A.L. 1986. Serological tests for detection of antibody to rodent viruses.*Viral and Mycoplasmal Infections of Laboratory Rodents. Effects on Biomedical Research*. P.N. Bhatt, R.O. Jacoby, A.C. Morse III et A.E. New (Edit.), Academic Press, New York, pages 731-776.

St. Hill, C.A., Finn, R. et Denye, E. 1973. Depression of cellular immunity in pregnancy due to a serum factor. Br. Med. J. iii: 513-514.

Theiler, M. 1930. Studies on the action of yellow fever virus in mice. Ann. Trop. Med. 24: 249-272.

Theiler, M. 1934. Spontaneous encephalomyelitis of mice: a new virus disease. Science 80: 122.

Welsh, R.M. 1978. Cytotoxic cells induced during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice. I. Characterization of natural killer cell induction. J. Exp. Med. 148: 163-181.

Whitman, L. 1943. Modified intraperitoneal protection test for yellow fever based on greater susceptibility of immature white mice to extraneural injection of yellow fever virus. Am J. Trop. Med. Hyg. 23: 17-36.

5

TECHNIQUE D'INJECTION DES ANIMAUX

Pierre J. Talbot

1. INTRODUCTION

Divers aspects de la virologie moderne font appel à des animaux de laboratoire, soit comme modèles d'interactions entre un virus et un organisme vivant, soit comme outil de préparation de diverses substances biologiques. Le but du présent chapitre est de fournir des précisions détaillées sur quelques techniques d'inoculation de solutions aux animaux de laboratoire, permettant ainsi au lecteur de faire par lui-même l'apprentissage de ces techniques. La souris, étant donnée son utilisation fréquente, est utilisée pour fins d'illustration.

2. MATÉRIEL

2.1. SERINGUES

On utilise généralement des seringues jetables en plastique. Celles-ci sont disponibles commercialement en emballages individuels stériles. Un format de 1 mL, de type "tuberculine" est couramment utilisé pour l'injection des souris. D'autres formats: 3, 5, 10 et 20 mL sont aussi disponibles avec un embout breveté de type "Luer Lok" permettant d'y visser les aiguilles appropriées. Les seringues de tels formats sont surtout utilisées pour les injections intrapéritonéales.

2.2. AIGUILLES

Les aiguilles utilisées pour injection consistent en un baril biseauté fait d'acier inoxydable et fixé à un adaptateur de plastique dont la couleur est caractéristique du format de l'aiguille. Elles sont présentées dans un protecteur de plastique, en emballages individuels et stériles. L'identification du format de l'aiguille consiste en un nombre entre 18 et 27 précédant la lettre G (diamètre du baril) et suivi d'un second nombre indiquant la longueur du baril (entre 9.5 et 38 mm ou 3/8 et 1 1/2 pouce). Il est à noter que plus le nombre indiquant le diamètre du baril est élevé, plus ce diamètre est petit.

3. MÉTHODES

Avant l'injection, le matériel à injecter est préalablement inséré dans la seringue; une aiguille est fixée à celle-ci et toutes les bulles d'air sont forcées à l'extérieur en tenant la seringue pointée vers le haut tout en tapant le baril de plastique avec le doigt, suivi d'un mouvement du piston vers le haut. On répète le procédé jusqu'à ce que toutes les bulles d'air soient éliminées (effectuer cette opération sous une hotte laminaire si le matériel à inoculer est pathogène).

3.1. INJECTION INTRAPÉRITONÉALE

D'une main, prendre la souris par la queue entre le pouce et l'index d'une main et la laisser s'agripper au grillage du couvercle de la cage. Avec l'autre main, prendre entre le pouce et l'index la peau du cou de l'animal après avoir placé son corps en légère tension en tirant sur la queue. Maintenir cette tension en plaçant la queue entre l'annulaire et l'auriculaire de la même main qui tient la peau du cou, de façon à ce que l'animal repose dans la paume de cette main. Placer finalement le majeur sous la souris de façon à ce que l'abdomen soit légèrement en saillie. Injecter à un angle d'environ 45°, l'aiguille étant dirigée vers le haut et insérée dans la portion inférieure de l'abdomen, soit à gauche ou à droite de la ligne médiane (Figure 1). L'aiguille ne devrait pas pénétrer plus de 5 mm environ. Les formats d'aiguilles recommandés sont les suivants: 25Gx16 mm (5/8 pouce) pour l'injection de solutions aqueuses et 23Gx25 mm (1 pouce) pour l'injection d'émulsions (par exemple des immunogènes dans l'adjuvant de Freund). Il est recommandé de ne pas injecter plus de 0.5 mL.

3.2. INJECTION INTRAVEINEUSE

Faire gonfler la veine de la queue de la souris, soit par immersion dans l'eau relativement chaude, soit par exposition aux rayons d'une lampe chauffante. Placer la souris dans un dispositif qui la maintiendra immobile tout en donnant accès à sa queue. Un tel dispositif peut être facilement fabriqué en fixant sur une planche de bois, de façon perpendiculaire, une seconde planche dans laquelle une encoche en forme de "V" a été coupée (Figure 2).

L'animal est placé d'un côté, sa queue projetant de l'autre côté. Il suffit alors de tirer légèrement sur la queue pour maintenir l'animal immobile. Certains dispositifs sont aussi disponibles commercialement.

En tenant l'aiguille (format suggéré: 26Gx13 mm, ou 1/2 pouce) avec son biseau vers le bas, insérer dans la veine de la queue, le plus près possible de son extrémité. Commencer à injecter: si l'aiguille est bien dans la veine, le liquide injecté déplacera la circulation sanguine; sinon, il y aura boursouflure étant donnée l'injection dans les tissus. Dans ce dernier cas, répéter l'injection un peu plus loin du bout de la queue. Il est à noter que la pointe de l'aiguille est utilisée pour soulever le tissu recouvrant la queue et donner ainsi accès à la veine. Il est très important de maintenir l'aiguille la plus parallèle possible à la veine, de manière à ne pas passer au travers de celle-ci. Ne pas injecter plus de 0.2 mL. Une fois l'injection terminée et l'aiguille retirée, appliquer une légère pression sur le site d'injection pendant quelques instants pour prévenir une hémorragie.

3.3. INJECTION INTRACÉRÉBRALE

Utiliser une seringue de 1 mL avec une aiguille de format 26 ou 27G (longueur 9.5 ou 13 mm, soit 3/8 ou 1/2 pouce). Anesthésier la souris en la plaçant quelques instants dans un bocal de verre fermé dans le fond duquel on a placé de la ouate imbibée d'éther a été placée. Déposer l'animal endormi sur la table de travail, à plat sur son abdomen. Faire pénétrer l'aiguille au travers de la boîte crânienne en lui imprimant un mouvement de rotation. Le site d'injection se situe dans un des deux hémisphères cérébraux, quelques millimètres derrière les yeux (Figure 3). Une fois la boîte crânienne transpercée, l'aiguille ne doit pas pénétrer plus de 4 mm (ceci est plus difficile avec des animaux plus âgés). Il est conseillé de ne pas injecter plus de 0.05 mL. Retirer ensuite l'aiguille et appliquer si nécessaire une pression au site d'injection en cas d'écoulement. S'assurer que l'animal se réveille bien, en le stimulant si nécessaire avec un léger jet d'air. De légères pressions exercées sur la région cardiaque avec le doigt peuvent quelquefois s'avérer nécessaires si le stress de l'injection a suscité un arrêt cardiaque. Vérifier l'état de santé de l'animal le lendemain.

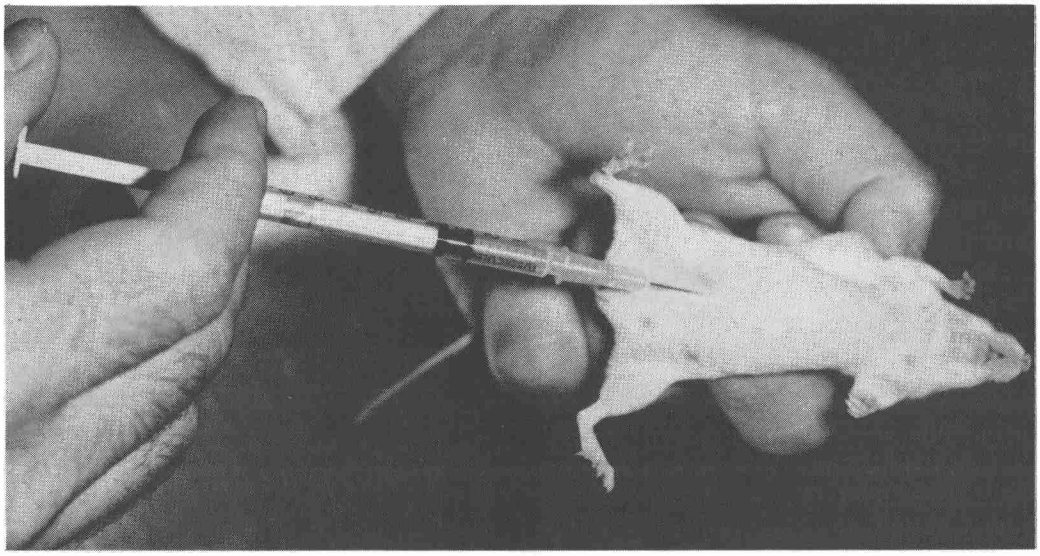


Figure 1

Injection intrapéritonéale

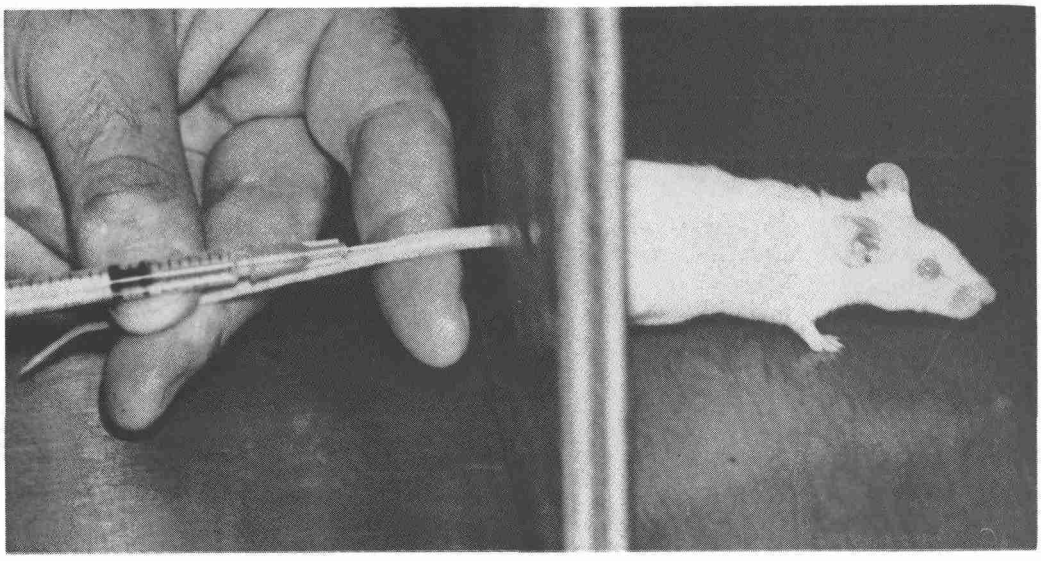


Figure 2

Injection intraveineuse

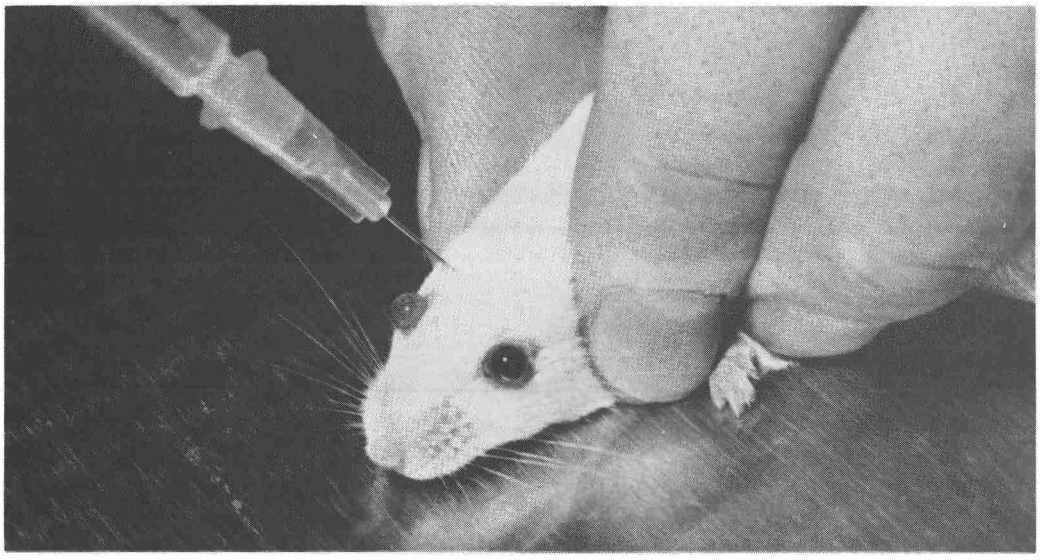


Figure 3

Injection intracérébrale

6

CONCENTRATION DES VIRUS

Pierre Payment et Michel Trudel

1. INTRODUCTION

Les virus peuvent être présents dans tous les liquides biologiques ou encore dans des milieux de culture artificiels: leur concentration et leur purification doivent donc être adaptées à ces milieux.

Les virus obtenus en cultures cellulaires sont relativement faciles à purifier car les milieux de culture sont libres de particules qui pourraient interférer et les concentrations en protéines sont généralement faibles. Au contraire, les virus qui doivent être purifiés à partir de selles (virus des gastro-entérites par exemple), du sang (virus de l'hépatite B, virus de l'immunodépression humaine) ou de tissus (virus de la rage dans le cerveau) sont entourés d'éléments particulaires ou peptidiques qui constituent des problèmes importants au moment de la purification. Tous ces problèmes peuvent être résolus par une combinaison appropriée de méthodes de centrifugation différentielle et zonale, de précipitation plus ou moins sélective, de filtration moléculaire ou de méthodes chromatographiques. Enfin, il est parfois utile d'adapter la méthode de production du virus pour obtenir des quantités plus élevées de particules, et ce, même aux dépens d'un accroissement de la quantité de protéines interférentes: le virus de l'influenza peut être produit en cultures cellulaires mais les titres viraux obtenus ne peuvent rivaliser avec ceux obtenus par l'inoculation d'oeufs embryonnés.

2. MÉTHODES

Les méthodes de concentration qui sont décrites ici s'appliquent à la plupart des virus mais elles ne sont pas exhaustives: on peut aussi utiliser les méthodes biologiques (adsorption-élution), chimiques ou chromatographiques.

2.1. HYDROEXTRACTION

Cette méthode est l'une des plus simples et consiste essentiellement à réduire la quantité d'eau présente dans l'échantillon. En utilisant le principe de la dialyse contre une substance de masse moléculaire élevée et une membrane perméable aux substances de faible masse moléculaire, il est possible de réduire considérablement le volume. Cette méthode s'applique à des volumes d'échantillon ne dépassant pas un litre et à des virus assez

résistants, car il s'agit d'un processus assez lent (Ramia et Sattar 1980).

Le tube à dialyse peut être obtenu dans une variété de diamètres et de porosités, mais celui qui ne permet pas le passage des molécules de plus de 10 000 Daltons constitue un bon compromis entre le temps de concentration et la rétention des molécules virales. La substance de haute masse moléculaire qui provoquera la migration de l'eau vers l'extérieur du tube peut être toute substance ayant une masse moléculaire suffisante pour ne pas pénétrer la membrane. La plus utilisée reste le polyéthylène-glycol polymérique sous sa forme 20 000 (Carbowax 20M, Union Carbide). Cette substance très hygroscopique se présente sous la forme d'une poudre ou de flocons: elle est facile à manipuler et n'affecte ni les virus, ni les protéines.

Méthode

1. Couper une longueur appropriée de tube à dialyse (Spectrapor) et la placer dans de l'eau distillée bouillante pendant 5 min afin d'éliminer les contaminants et les agents de conservation.

2. Fermer l'une des extrémités en y faisant un noeud ou en utilisant des fermetures spéciales en forme de pinces (Spectrapor). Remplir le tube à dialyse avec le matériel à concentrer puis fermer l'autre extrémité par un noeud ou une fermeture.

3. Placer ce tube à dialyse sur une couche de 2 à 3 cm de Carbowax 20M dans un plat. Vaporiser un peu d'eau distillée sur le tube, puis le recouvrir d'une nouvelle couche de Carbowax.

4. Placer à 4°C le temps nécessaire pour obtenir la concentration requise (2 à 24 h).

5. Retirer le tube maintenant affaissé de la masse épaisse qui s'est formée. Laver soigneusement à l'eau du robinet jusqu'à ce que l'extérieur du tube soit débarrassé de sa couche gélatineuse.

6. Ouvrir le tube à l'une de ses extrémités et recueillir le liquide concentré ou, s'il ne reste plus de liquide, ajouter quelques millilitres de tampon et rincer soigneusement l'intérieur du tube.

2.2. PRÉCIPITATION

Puisque les virus sont des colloïdes, il est possible de changer leur charge électrique et en provoquer la précipitation. Deux substances sont fréquemment utilisées en virologie pour obtenir cette précipitation: le polyéthylène-glycol et le sulfate d'ammonium (Philipson *et al.* 1960, Trépanier *et al.* 1981, Payment et Trudel 1985).

2.2.1. Précipitation au polyéthylène glycol

1. Le matériel à concentrer est d'abord clarifié par centrifugation à faible vitesse (1 000 à 5 000 x *g*) pour éliminer les débris.

2. Ajouter du chlorure de sodium à une concentration finale de 0.5 M.

3. Ajouter le polyéthylène-glycol (PEG 6 000–8 000, Union Carbide) jusqu'à l'obtention de la concentration optimale pour la précipitation du virus. Cette concentration varie généralement entre 6 et 10% (p/v) et doit être déterminée par des expériences préliminaires. Le polyéthylène glycol peut

être ajouté sous forme solide ou, si l'opération doit se faire stérilement, à partir d'une solution à 50% (p/v) stérilisée à l'autoclave.

4. Laisser de 4 à 18 h à 4°C pour permettre la formation des ponts intermoléculaires.

5. Centrifuger pendant 30 min à 5 000–10 000 x *g* pour sédimenter le précipité. Le culot obtenu est solubilisé dans un volume de tampon égal à environ 1 à 5% du volume original.

2.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium

1. Préparer une solution saturée à 100% de sulfate d'ammonium en dissolvant 800 *g* de sulfate d'ammonium dans un litre d'eau distillée à 20°C. Ajuster cette solution à pH 7.5.

2. Ajouter à la suspension de virus à concentrer suffisamment de la solution saturée pour obtenir 30 à 50% de saturation.

3. Laisser sous agitation lente pendant 1 à 4 h.

4. Centrifuger pendant 30 min à 5 000 à 10 000 x *g* pour sédimenter le précipité. Le précipité sera plus ou moins important selon la concentration en protéines du milieu et sera recueilli par solubilisation dans un volume de tampon égal à 1 à 5% du volume original.

2.3. FILTRATION MOLÉCULAIRE

Au cours d'une filtration moléculaire, les molécules seront séparées selon leur dimension par des membranes de porosités variées. Ces membranes ont des pores ayant moins de 10 nm de diamètre et ne laisseront donc pas passer les virus dont le diamètre est supérieur à 20 nm. Les membranes peuvent être obtenues sous différentes formes avec des limites d'exclusions variant de quelques centaines à 10^6 Daltons. Nous décrirons brièvement les différents types de support pour ces membranes ainsi que leurs avantages et désavantages.

2.3.1. Cellules sous agitation

Il s'agit du système le plus simple dans lequel la membrane sous la forme d'un disque plat (50 à 100 cm^2) est scellée au fond d'un réservoir (100 mL à 1 L) qui est pressurisé par un gaz inerte, généralement de l'azote, et dans lequel le liquide est maintenu en agitation continue par un barreau magnétique. La pression étant appliquée verticalement, la membrane se colmate rapidement, limitant l'applicabilité du système à de faibles volumes de suspensions contenant peu de protéines.

2.3.2. En canal et tangentielle

Afin de réduire les problèmes associés aux cellules sous agitation, on a développé des systèmes dans lesquels le liquide à concentrer est mis en contact avec les membranes par des canaux plus ou moins larges. Plus ces canaux sont petits, plus la vitesse du liquide est élevée, réduisant ainsi le risque de colmatage dû à la pression. De plus, on a augmenté la surface de filtration par l'addition de modules superposables où le liquide est maintenu en circulation par une pompe péristaltique qui fournit aussi la pression nécessaire. Les débits dans ces systèmes atteignent 10 mL/cm^2 /min soit de 0.1 à 1 L/min permettant ainsi la concentration de 10 à 100 L par jour.

2.3.3. Fibres creuses

Les fibres creuses sont une extension du principe de l'augmentation de la surface et du débit: cette fois, on utilise des fibres creuses ayant un diamètre interne de moins de 1 mm, fibres qui sont groupées en paquet de plusieurs centaines de fibres offrant une grande surface de contact et un grand débit. Ces systèmes sont offerts en plusieurs formats permettant la concentration rapide de volumes de 1 L à plusieurs centaines de litres en moins d'une journée.

Figure 1

Cartouche ultrafiltrante formée de fibres creuses

3. APPLICATIONS

A titre d'exemple, nous présentons ici la méthode utilisée pour la concentration du virus de la rubéole à partir de 100 L de surnageant de cultures cellulaires infectées (Trudel et Payment 1980).

1. Filtrer le liquide à concentrer sur un filtre capable de retenir les particules de plus de 10 µm (Millipore, préfiltre AP–25 par exemple, sous forme de disque de 142 mm). La plupart des systèmes de filtration moléculaire contiennent déjà un préfiltre de 100 µm.

2. La concentration se fera d'abord sur un système de fibres creuses à grand débit (ex. Amicon DC–10) équipé d'une cartouche ayant une exclusion moléculaire de 100 000 Daltons (Amicon H10–100). Le liquide circule à un débit de 15 L/min et une pression de 120 kPa (20 psi) est maintenue dans le système: dans ces conditions, le débit de l'ultrafiltrat est de 600–800 mL/min. Le liquide à concentrer est placé dans des récipients qui sont maintenus dans de l'eau froide (4°C) ou sur de la glace. La filtration est arrêtée lorsque le volume de concentré atteint environ 2 L.

3. Transférer le concentré dans un système de filtration moléculaire plus petit, afin de le volume final volume à moins de 100 mL. Nous utilisons un système Amicon DH–4 équipé d'une membrane ayant une exclusion moléculaire de 100 000 Daltons (H1P–100). Le liquide est maintenu en circulation à 500 mL/ min à une pression de 70 kPa (10 psi) permettant un débit d'ultrafiltrat de 15–20 mL/min. Le volume final est de 50 à 100 mL.

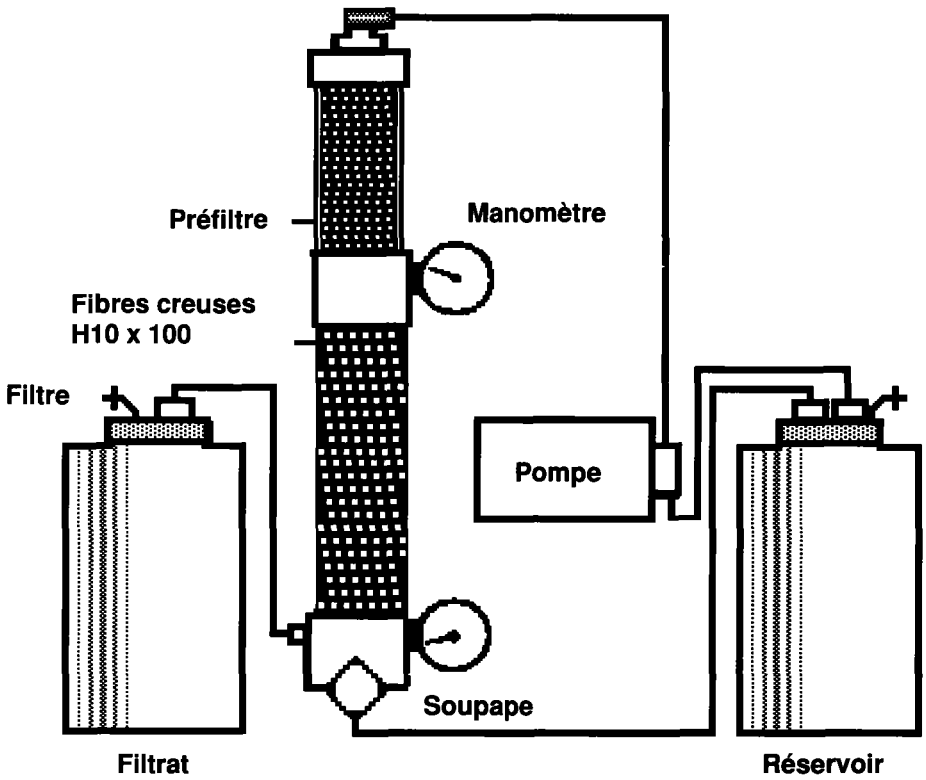
Concentration du virus de la rubéole par filtration moléculaire: exemple de résultats

	Volume	Protéines	Virus[a]	%
Surnageant cellulaire	50 000 mL	60 µg	6.4×10^7	100%
Concentré 1 (DC-10)	1 450 mL	15 µg	5.9×10^7	93%
Concentré 2 (DH-4)	75 mL	1.1 µg	4.9×10^7	83%

[a] Concentration virale exprimée en unités hémagglutinantes totales.

Figure 2

Système d'infiltration



Le liquide surnageant provenant d'une culture cellulaire infectée par le virus contenu dans le réservoir est recirculé par une pompe à travers les fibres de la cartouche d'ultrafiltration jusqu'à ce que la concentration désirée soit atteinte. Le concentré est recueilli dans le réservoir alors que le filtrat est recueilli dans un autre récipient.

4. RÉFÉRENCES

Payment, P. et Trudel, M. 1985. Concentration and purification of viruses by molecular filtration and ultracentrifugation methods. Chap. 34 dans *Biotechnology: applications and research*. P. N. Cheremisinoff et R. P. Ouellette (Édit.) Technomic Publishing Co. Inc, Lancaster, Basel.

Philipson, L., Albertson, P.A. et Frick, G. 1960. The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems. Virology 11: 553–571.

Ramia, S. et Sattar, S.A. 1980. Concentration of seeded simian rotavirus SA-11 from potable waters using talc-Celite layers and hydroextraction. App. Envir. Microbiol 39: 493–449.

Trépanier, P., Payment, P. et Trudel, M. 1981. Concentration and purification of human respiratory syncitial virus using ammonium sulfate, polyethylene glycol and hollow fiber ultrafiltration. J. Virol. Meth. 3: 201–211.

Trudel, M., et Payment, P. 1980. Concentration and purification of rubella virus hemagglutinin by hollow-fiber ultrafiltration and sucrose density gradient centrifugation. Can. J. Microbiol. 26: 1334-1339.

7

QUANTIFICATION DES PROTÉINES

Pierre J. Talbot

1. INTRODUCTION

La détermination rigoureuse de la concentration protéique requiert l'hydrolyse acide suivie d'une analyse d'acides aminés. Toutefois, quelques méthodes plus pratiques ont été développées. Bien que moins précises et affectées par la composition en acides aminés de la protéine, elles constituent tout de même une alternative acceptable lorsque l'utilisateur demeure conscient de leurs limites. Trois méthodes sont d'usage courant: l'absorbance en ultraviolet, le test de Lowry et celui de Bradford. La détermination de l'absorbance à 280 nm est la méthode la moins sensible et la plus rapide; les techniques faisant appel au réactif phénolique de Folin en présence de cuivre (Lowry *et al.* 1951) et à la liaison du bleu de Coomassie aux protéines (Bradford 1976) sont plus sensibles et relativement simples d'éxécution, particulièrement cette dernière.

2. TECHNIQUE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE

Les protéines absorbent la lumière ultraviolette d'une longueur d'onde de 280 nm selon leurs caractéristiques intrinsèques. Cette propriété est caractérisée par un coefficient d'extinction molaire ou spécifique. Le premier, symbolisé par ε, indique l'absorbance (densité optique) d'une solution pure de la protéine à une concentration de 1 M. Le second, symbolisé par $E_{(1\%,1\ cm)}$, indique l'absorbance d'une solution contenant 1 g de protéine pure dans 100 mL de solution, ou 1% (p/v). Dans les deux cas, le parcours lumineux à travers la solution sera de 1 cm, ce qui est le cas pour la majorité des cuvettes pour spectrophotomètre. Selon la loi de Beer-Lambert, qui assume un faisceau parallèle d'une lumière monochromatique dans un milieu isotrope (c'est-à-dire où les molécules absorbantes sont distribuées uniformément), l'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique, en autant que celle-ci ne dépasse pas un seuil critique.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times C \times L$$

ou encore:

$$A = E^{1\%}_{1\,cm} \times c \times L$$

et en transmittance:

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100$$

Dans cette formule:

- ε : coefficient d'extinction molaire (M^{-1} cm^{-1})
- $E^{1\%}_{1\,cm}$: coefficient d'extinction spécifique
- A : absorbance (densité optique)
- I_0 : intensité du faisceau incident
- I : intensité du faisceau après passage à travers la solution protéique
- C : concentration protéique (M)
- c : concentration protéique (g/100 mL)
- L : longueur du parcours optique (cm)
- T : transmittance (% lumière transmise)

L'estimation de la concentration d'une protéine peut donc se faire lorsque l'on connaît son coefficient d'extinction, soit en le mesurant à partir d'une solution standard de protéine pure, soit en consultant des tables déjà établies pour certaines protéines. La longueur du parcours optique (L) étant généralement de 1 cm, l'équation précédente devient:

$$C = \frac{A}{\varepsilon} \quad \text{ou} \quad c = \frac{A}{E^{1\%}_{1\,cm}}$$

L'avantage de cette technique demeure sa grande simplicité. Les désavantages consistent en une faible sensibilité, environ 10 fois inférieure aux deux techniques décrites plus loin (Peterson 1979), et la nécessité de connaître les propriétés spectrophotométriques de la protéine à l'étude. Toutefois, cette technique demeure très utile dans des circonstances où une évaluation qualitative de la présence de protéines est suffisante, telle la purification de protéines par chromatographie.

3. TECHNIQUES COLORIMÉTRIQUES

3.1. TEST DE LOWRY

La méthode classique de Lowry *et al.* (1951) demeure le test de quantification le plus utilisé. Il fait appel au réactif phénolique de Folin et Ciocalteu, dont le principe actif est un acide mixte phosphomolybdique-tungstique qui est réduit par les protéines avec une perte de 1 à 3 atomes d'oxygène du molybdate et/ou tungstate. Cette réduction entraîne la formation d'un ou plusieurs produits réduits qui absorbent la lumière bleue (longueur d'onde optimale de 750 nm). La présence de cuivre dans la réaction facilite le transfert d'électrons du polypeptide au chromogène acide, augmentant ainsi la sensibilité de la technique. Les acides aminés les plus actifs dans une telle réaction sont la tyrosine, le tryptophane et, à un degré moindre, la cystine, la cystéine et l'histidine. Le test est donc affecté par la composition en acides aminés des protéines à mesurer, beaucoup moins toutefois que dans la technique spectrophotométrique décrite précédemment. La technique originale est décrite ci-après. Une description très complète des différentes substances pouvant interférer avec le test et des modifications apportées

au protocole original peut être retrouvée dans l'excellent article de Peterson (1979). La concentration maximale tolérable des principales substances interférantes est la suivante:

Tris	100 µM
HEPES	1 µM
EDTA	50 µM
Triton X-100	0.001% (p/v)
Désoxycholate de sodium	0.01% (p/v)
SDS	0.05% (p/v)
2-mercaptoéthanol	0.7 mM
NaCl	0.7 M
Saccharose	10 mM
Glycérol	10% (v/v)

Solutions

Solution A-1: Tartrate de sodium ou potassium 2% (p/v)

Solution A-2: Sulfate de cuivre ($CuS0_4.5H_2O$) 1% (p/v)

Solution A-3: Carbonate de sodium 2% (p/v) dans NaOH 0.1 N

Réactif A: (jeter après une journée)

Solution A-1	0.5 mL
Solution A-2	0.5 mL
Solution A-3	50 mL

Réactif B:

Réactif phénolique de Folin-Ciocalteu 1.0 N (diluer le réactif commercial 2.0 N dans l'eau distillée)

Standard protéique:

Albumine sérique bovine 1 mg/ mL (conserver congelée à –20°C)

Méthode

1. Dans un tube contenant 0.2 mL d'échantillon, dilué si nécessaire dans de l'eau distillée, ajouter 1.0 mL du réactif A et bien mélanger au Vortex. Il est préférable de tester chaque échantillon en duplicata.

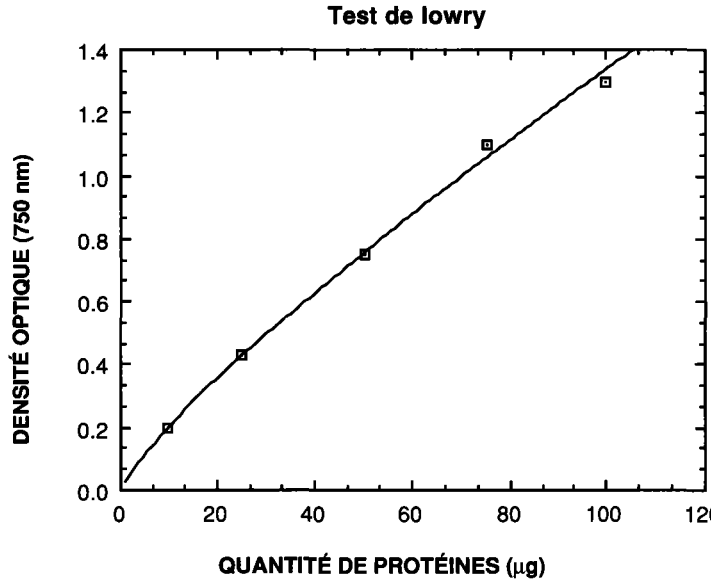
2. Laisser reposer pendant 10 min à la température de la pièce.

3. Ajouter rapidement tout en mélangeant aussitôt au Vortex, 0.1 mL du réactif B. Laisser reposer pendant 30-60 min à la température de la pièce.

4. Lire l'absorbance à 750 nm et déterminer la concentration sur une courbe standard qui est constituée pour chaque test avec le standard protéique, de la façon suivante:

Albumine (µL):	0	10	25	50	75	100	150	200
H_2O (µL):	200	190	175	150	125	100	50	0
Protéine (µg):	0	10	25	50	75	100	150	200

Chaque dilution est effectuée en duplicata et l'on trace une courbe d'absorbance à 750 nm en fonction de la quantité de protéines. Il s'agit alors d'extrapoler la quantité de protéines dans l'échantillon à partir de cette courbe .



3.2. TEST DE LIAISON DU COLORANT

Cette technique (Bradford 1976) gagne en popularité par sa simplicité alliée à une sensibilité équivalente au test de Lowry et une interférence réduite de substances qui peuvent fausser les résultats de ce dernier. De plus, les réactifs nécessaires sont maintenant disponibles commercialement (Bio Rad). Le test de Bradford est basé sur l'observation que le pic d'absorbance d'une solution acide de bleu de Coomassie G–250 passe de 465 (rouge) à 595–600 nm (bleu) après liaison aux groupements aminés libres des protéines. Toutefois, cette technique est plus sensible à la composition protéique de l'échantillon (surtout le contenu en lysine) et donne souvent lieu à des courbes standards non-linéaires (Peterson 1981); elle doit donc être utilisée avec plus de précaution que le test de Lowry, l'échantillon ne devant cependant pas contenir plus de 0.1% de Triton X-100 ou SDS.

Solutions

Solution de colorant

Cette solution contient le bleu brillant de Coomassie G–250 dissous dans de l'éthanol ou du méthanol et de l'acide phosphorique (Bradford 1976). Nous trouvons plus pratique d'utiliser la solution concentrée vendue par Bio–Rad.

Standards protéiques

Albumine sérique bovine ou immunoglobuline G bovine (dissoute dans le même tampon que l'échantillon et gardes à –20°C):

Test standard:	1.25 mg/mL
Test standard modifié:	0.25 mg/mL
Microtest:	0.025 ou 0.050 mg/mL

Test standard

(25-125 µg; 0.25-1.25 mg/ mL)

1. Diluer la solution de colorant (Bio–Rad) dans 4 volumes d'eau distillée, filtrer sur papier Whatman No 1 et garder dans un contenant de verre à la température de la pièce pendant deux semaines au maximum.

2. Dans un tube contenant 0.1 mL d'échantillon (dilué si nécessaire dans un tampon approprié, en prenant soin d'avoir un contrôle contenant seulement ce tampon), ajouter 5 mL de solution colorante diluée et bien mélanger au Vortex. Chaque échantillon est testé en duplicata lorsque possible.

3. Lire l'absorbance (contre de l'eau distillée) à 595-600 nm après 5 min et moins de 60 min. L'utilisation de cuvettes de plastique minimise l'absorption du colorant à la cuvette lorsque celles-ci sont en quartz ou en verre. Si des cuvettes de plastique ne sont pas disponibles, il est important de bien laver les cuvettes avec de l'acétone ou du méthanol entre chaque lecture.

Une courbe standard est constituée pour chaque test avec un des standards protéiques, de la façon suivante, en utilisant le standard 1.25 mg/mL :

Standard (µL) :	0	20	40	60	80	100
Tampon (µL):	100	90	60	40	20	0
Protéine (µg):	0	25	50	75	100	125

Chaque dilution est effectuée en duplicata et une courbe d'absorbance à 595-600 nm en fonction de la quantité de protéine est tracée. Il s'agit alors d'extrapoler dans courbe pour déterminer la quantité de protéine présente dans l'échantillon. L'albumine produit un développement de couleur beaucoup plus prononcé et n'est appropriée comme standard que lorsque l'échantillon contient beaucoup d'albumine ou de protéine(s) donnant un développement de couleur similaire. En général, l'IgG constitue un standard protéique plus approprié, quoique, comme dans tout test protéique, le meilleur contrôle demeure toujours la protéine que l'on veut mesurer.

Test standard modifié (25-125 µg/mL)

Cette modification du test standard permet de mesurer des solutions protéiques plus diluées, en plus d'économiser la solution de colorant.

1. Diluer la solution de colorant (Bio–Rad) dans 3.25 volumes d'eau distillée et filtrer comme ci-haut.

2. Le test s'effectue tel que décrit pour le test standard sauf que l'échantillon est de 0.5 mL au lieu de 0.1 mL, et que 2.5 mL au lieu de 5.0 mL de solution de colorant diluée sont ajoutés.

La courbe standard est constituée comme suit en utilisant le standard 0.25 mg/ mL:

Standard (µL):	0	100	200	300	400	500
Tampon (µL):	500	400	300	200	100	0
Protéine (µg):	0	25	50	75	100	125

Microtest (1-20 µg; 1.25-25 µg/ mL)

La solution du colorant (BioRad) est utilisée telle quelle. Pour le test, on utilise 0.8 mL d'échantillon auquel on ajoute 0.2 mL de solution de colorant concentrée.

La courbe standard est constituée comme suit en utilisant le standard 25 µg/ mL :

Standard (µL):	0	40	80	160	300	480	640	800
Tampon (µL):	800	760	720	640	500	320	160	0
Protéine (µg):	0	1	2	4	7.5	12	16	20

Microtest adapté aux micro–cabarets (0.5-5 µg; 5-50 µg/ mL)

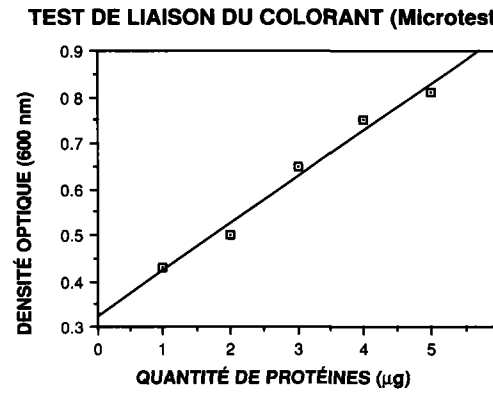
Les microcabarets à 96 puits à fond plat sont utilisés couramment pour les tests immunoenzymatiques et les resultats sont lus dans un spectrophotomètre à faisceaux verticaux (Titertek, Flow Laboratories ou l'équivalent). Il est donc pratique d'effectuer le test de quantification des protéines lorsque plusieurs échantillons doivent être analysés (Redinbaugh et Campbell 1985).

1. Diluer la solution de colorant (Bio–Rad) dans 1.5 volumes d'eau distillée et filtrer comme ci-haut.

2. Ajouter 0.1 mL de cette solution à 0.1 mL d'échantillon et lire l'absorbance à 595-600 nm dans un spectrophotomètre approprié.

La courbe standard est constituée comme suit en utilisant le standard 50 µg/ mL :

Standard (µL):	0	20	40	60	80	100
Tampon (µL):	100	80	60	40	20	0
Protéine (µg):	0	1	2	3	4	5



3. RÉFÉRENCES

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-274.

Peterson, G.L. 1979. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. Anal. Biochem. 100: 201-220.

Rendinbaugh, M.G. et Campbell, W.H. 1985. Adaptation of the dye-binding protein assay to microtiter plates. Anal. Biochem. 147:144-147.

8

PURIFICATION ET ANALYSE DES VIRUS PAR ULTRACENTRIFUGATION

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

Les virus sont des agents infectieux de nature particulaire qui sont essentiellement composés d'acide nucléique, ADN ou ARN, condensé avec une ou plusieurs protéines pour former la nucléocapside (Figure 1a). De plus, une bonne proportion des virus sont entourés d'une enveloppe dérivée des membranes de la cellule hôte mais possédant des protéines virales propres (Figure 1b). Depuis son introduction il y a plus de 30 ans, l'ultracentrifugation s'est imposée comme méthode de préparation et d'analyse des virus (Brakke 1951 et 1953). On identifie deux types de centrifugation: la centrifugation différentielle et la centrifugation en gradient de densité. Les utilisateurs éventuels de ces techniques préparatives ou analytiques sont invités à consulter les revues de Griffith (1986), Birnie et Rickwood (1978) et Hinton et Dobrota (1976). L'équipement de centrifugation décrit ici et utilisé dans nos laboratoires est celui de Beckman (Palo Alto, Californie, USA).

2. CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE

La centrifugation différentielle est la méthode la plus simple: une suspension contenant des particules virales est soumise par rotation à une force centrifuge (Figure 2a). On obtient deux fractions: un culot qui contient le matériel sédimentable et le surnageant qui contient le matériel en suspension. Suivant les paramètres de centrifugation (force gravitationnelle et temps), l'on peut clarifier une suspension virale de ses débris cellulaires laissant le virus en suspension (20 000 x g, 15 min) ou encore déposer au culot le virus en augmentant la vitesse et le temps (100 000 x g, 60 min). Toutefois, la sédimentation au culot des virus peut entraîner leur inactivation, spécialement les virus enveloppés. Il est alors recommandé d'utiliser un coussin d'une solution plus dense que le virus (chlorure de césium, saccharose, tartrate de potassium, Nycodenz, etc.); dans ce cas, la particule virale va flotter sur le coussin, l'em-

pêchant d'être écrasée et inactivée au fond du tube (Figure 2b). Si le coefficient de sédimentation du virus est connu, il est possible de prédéterminer le temps de centrifugation requis pour déposer les virus au culot ou sur le coussin; pour ce calcul, on utilise le facteur d'efficacité du rotor (K) tel que calculé par le fabricant et l'équation suivante:

$$T(\text{heures}) = \frac{K}{S_{20w}}$$

Le facteur K est calculé par le fabricant du rotor lorsque ce dernier est utilisé à sa vitesse maximale (voir section 4.3).

3. CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITÉ

Il est évident que les applications de la centrifugation différentielle sont très limitées, puisque toutes les particules ayant la même vitesse de sédimentation migrent en même temps que les particules virales qui ne sont alors pas séparées des contaminants. Toutefois, si l'on place la suspension virale sur une colonne de liquide ayant une densité croissante, i.e. un gradient de densité, les virus vont migrer pendant la centrifugation selon leur grosseur ($S_{20,w}$) jusqu'à ce qu'ils atteignent leur densité de flottaison (d) ou qu'ils soient déposés au culot (Figure 3). Lorsque les virus sont centrifugés dans des conditions ne permettant pas d'atteindre la densité de flottaison, parce que la densité maximale du gradient est inférieure à celle du virus et que la centrifugation est arrêtée avant que les virus n'atteignent le fond du tube: on appelle zonale ce type de centrifugation. Lorsque les virus atteignent leur densité de flottaison, parce que la densité maximale du gradient est supérieure à la densité du virus et que la centrifugation se poursuit jusqu'à équilibre: on appelle isopycnique, ce type de centrifugation.

Trois aspects de la centrifugation en gradient de densité méritent une attention particulièrece sont: les milieux de centrifugation, les types de gradients et les rotors.

3.1. MILIEUX DE CENTRIFUGATION

Il n'existe pas de milieu universel pour la centrifugation des virus: c'est l'objectif visé par la centrifugation et le type de virus qui président au choix du milieu de centrifugation.

Les caractéristiques recherchées pour ces milieux sont les suivantes:

- qu'ils doivent couvrir le domaine de densité requis pour la purification virale (1.15–1.45 g/cm³)
- qu'ils doivent former des solutions de faibles force ionique, viscosité et osmolalité
- ils ne doivent pas affecter l'activité biologique du virus (infectivité, activité enzymatique, hémagglutination, fusion)
- leur concentration doit être facile à mesurer (indice de réfraction)
- ils doivent se dialyser ou être séparables par centrifugation différentielle
- ils ne doivent pas interférer avec les méthodes physicochimiques d'analyse du virus étudié (absorbance dans l'UV ou le visible, comptage radioactif, détermination des protéines)
- ils doivent être sécuritaires à utiliser (non-toxique, non-inflammable et non-corrosif)

Il existe essentiellement quatre types de milieux pouvant servir à la centrifugation

en gradient de densité: les sels inorganiques (chlorure de césium), les molécules organiques (saccharose, Ficoll et tartrate de potassium), les molécules aromatiques iodées (Nycodenz, métrizamide) et la silice colloïdale (Percoll). Leurs caractéristiques sont résumées dans le Tableau 1.

Les particules virales sont de deux types: les virus enveloppés et les virus nus. Les virus enveloppés ont une densité de flottaison variant de 1.18 à 1.25 g/cm³, alors que les virus nus ont une densité de flottaison plus élevée et variant de 1.28 à 1.45 g/cm3 (Tableau 2).

Les **sels inorganiques** , le chlorure de césium en particulier, ont été les premiers à être utilisés en virologie lors des études sur les bactériophages et le virus de la polio. Le chlorure de césium permet de préparer des solutions jusqu'à 1.9 g/cm³, qui peuvent servir pour la purification de tous les virus, mais l'ARN viral qui a une densité plus élevée encore ne peut être séparé: dans ce cas particulier, le trifluoroacétate de césium est recommandé puisqu'il a une densité maximale de 2.6 g/cm³ (voir Chapitre 24). Les gradients de chlorure de césium peuvent être préformés ou générés pendant la centrifugation (Figure 4). Dans ce dernier cas, le domaine de séparation est beaucoup plus restreint, par contre c'est la densité de tout l'échantillon qui est ajustée, permettant ainsi de purifier un volume plus grand. Le chlorure de césium absorbe très peu dans l'ultraviolet, se mesure facilement par réfractométrie car $d = (10.2402)\eta - (12.6483)$ et est compatible avec la plupart des liquides à scintillation pour le comptage radioactif. Ses caractéristiques indésirables sont sa force ionique et son osmolalité élevée, ce qui peut entraîner l'inactivation de plusieurs virus enveloppés.

Les **molécules organiques**, le saccharose plus particulièrement, connaissent un grande popularité pour la purification des virus. Le saccharose permet d'atteindre une densité maximale de 1.3 g/cm³ qui est suffisante pour séparer par densité de flottaison tous les virus enveloppés, mais pas les virus nus à cause de leur haute densité (1.28-1.45 g/cm³). Ces derniers peuvent cependant être séparés par centrifugation zonale ou dans des gradients de tartrate de potassium ou Nycodenz (densité maximale 1.45 g/cm³). La densité du saccharose se mesure facilement par réfractométrie puisque $d = (2.732)\eta - (2.6425)$. Le saccharose est facilement dialysable mais son osmolalité et sa viscosité sont élevées, ce qui peut endommager les virus labiles, plus spécifiquement les virus enveloppés. Le saccharose interfère dans les mesures d'acides nucléiques et de protéines dans certaines conditions, mais en général, il n'interfère pas dans les essais biologiques.

Le **tartrate de potassium** avec sa densité maximale de 1.48 g/cm³, présente de nombreux avantages dans les cas où le saccharose ne peut être utilisé; plusieurs auteurs le préfèrent au saccharose pour la purification de virus labiles.

Les **molécules aromatiques iodées**, dérivés de l'acide triiodobenzoïque, ont été utilisées avantageusement en purification virale. Sous forme de sels (métrizoate de sodium, rénographine) ou sous forme non-ionique (métrizamide, Nycodenz), ces produits forment des solutions stables à une densité maximale de 1.45 g/cm³. Ces solutions sont moins visqueuses que les solutions de saccharose et de Ficoll, et ont l'avantage d'être isoosmotiques. Elles se sont avérées utiles dans des situations où les milieux conventionnels, comme le saccharose ou le chlorure de césium, ont donné des résultats insa-

tisfaisants, en particulier avec les virus enveloppés.

Le **Nycodenz** (Nyeyaard Diagnostic, Oslo, Norvège) est un dérivé du métrizamide qui a été développé spécifiquement pour l'ultracentrifugation en gradient de densité. On peut l'utiliser en gradients préformés ou en gradients générés pendant la centrifugation tout comme le chlorure de césium. Comme il ne contient pas de sucre, il n'interfère pas avec les mesures d'acides nucléiques. Les protéines peuvent être mesurées au bleu de Coomassie et la radioactivité évaluée dans un scintillateur à base de toluène. L'activité biologique ou enzymatique des virus peut généralement être évaluée directement sans dialyse. La densité se mesure par réfractométrie avec la formule:

$$d= (3.242)\eta - (3.323).$$

La **silice colloïdale** vendue sous le nom de Percoll (Pharmacia, Upsalla, Suède) présente de nombreux avantages pour la purification de virus labiles:

- sa faible viscosité facilite l'obtention d'une séparation à l'équilibre (densité de flottaison) de particules ayant une vitesse de sédimentation de moins de 60S
- le Percoll est isoosmotique en solution tamponnée
- le gradient se génère très rapidement pendant la centrifugation (10-30min); toutefois le gradient généré est métastable parce que les particules de Percoll continuent à sédimenter, et
- l'on ne peut travailler que dans des rotors à angle fixe puisque les rotors horizontaux ne permettent pas de générer un champ de force suffisamment égal de bas en haut du tube.

D'autre part, l'utilisateur rencontrera des problèmes s'il veut enlever le Percoll de sa préparation virale, étant donnée la nature particulaire du produit (17-30 nm de diamètre). Il faudra recourir à une centrifugation sur coussin de saccharose, Nycodenz ou potassium tartrate.

A noter que les virus enveloppés ont une densité beaucoup plus faible en Percoll, d =1.05 g/cm^3, alors que les virus nus d= 1.1 g/cm^3. La plupart des activités biologiques sont conservées dans le Percoll et les protéines peuvent être mesurées avec le bleu de Coomassie ou le réactif de Folin-Ciocalteu.

3.2. TYPES DE GRADIENTS

Pour la préparation et l'analyse des virus, deux types de gradients sont couramment utilisés: gradient continu et gradient discontinu. Les gradients continus sont préparés en utilisant un formateur de gradient linéaire ou manuellement, en superposant différentes concentrations dans un tube de centrifugation et en laissant diffuser jusqu'à linéarité (une nuit à 4°C) (Figure 4). Dans les gradients de chlorure de césium, Nycodenz et Percoll, il est possible de générer un gradient linéaire pendant la centrifugation à partir d'une solution ajustée à une densité précise (Figure 5).

Les gradients linéaires permettent les meilleures séparations et sont requis pour l'analyse de la vitesse de sédimentation et de la densité de flottaison des particules virales ou de leurs sous-unités. Les gradients discontinus sont généralement préparés manuellement par superposition des concentrations désirées directement dans le tube de centrifugation. Ces

gradients sont avantageux pour la concentration de matériel viral et leur séparation des protéines solubles.

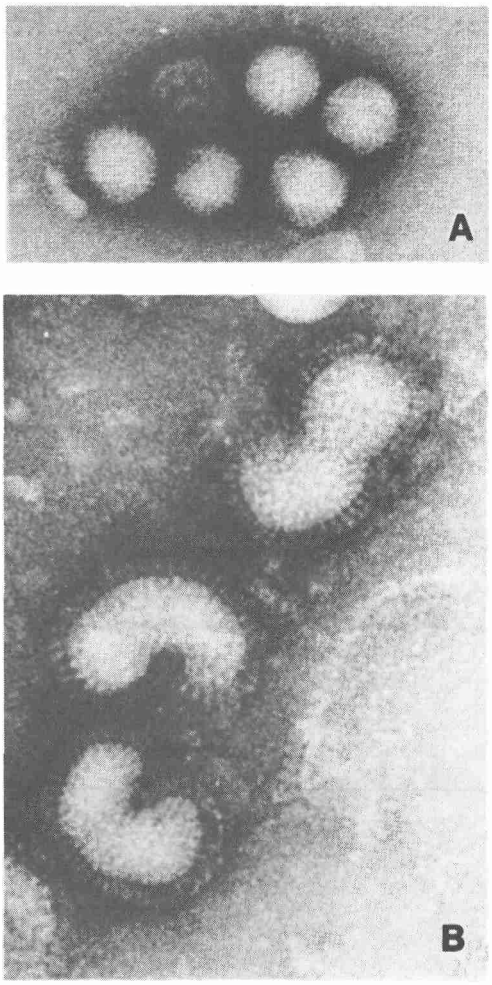


Figure 1

Adénovirus (A) et influenzavirus (B) tel qu'observés en microscopie électronique après imprégnation négative.

3.3. TYPES DE ROTORS

Il existe trois types principaux de rotors: les rotors à angle fixe incluant les rotors verticaux, les rotors horizontaux et les rotors zonaux (Figure 3 a, b, c).

Dans les ***rotors à angle fixe*** , les tubes de centrifugation sont maintenus à angle ou à la verticale selon le cas (Figure 3a, b) et c'est la phase liquide qui se réoriente pendant la centrifugation, créant ainsi un sentier de migration court pour les particules virales. Ces rotors sont utilisés principalement pour la sédimentation au culot ou pour la centrifugation isopycnique des virus. Plusieurs rotors de ce type sont disponibles à la compagnie Beckman, ils permettent d'atteindre des vitesses de 30 000 à 80 000 rpm correspondant à des forces gravitationnelles de 100 000 à 500 000 *x g*, permettant la sédimentation de virus dans des volumes pouvant atteindre jusqu'à 500 mL/ rotor. Tous ces rotors permettent la sédimentation de virus en une heure ou moins.

Dans le cas des ***rotors horizontaux*** ("swinging bucket"), contrairement aux rotors à angle fixe, c'est le tube qui est déplacé et orienté dans le champ de force durant la centrifugation (Figure 3c), créant ainsi un sentier de migration plus long favorisant la séparation et la purification des particules virales. Le temps de centrifugation est plus long et la qualité de la séparation est meilleure. L'utilisation d'un demi-gradient peut permettre de réduire le temps de centrifugation tout en donnant des résultats satisfaisants. Selon le rotor choisi, des vitesses de 25 000 à 65 000 rpm peuvent être atteintes, générant de 100 000 à 500 000 x *g*.

Dans le cas des ***rotors zonaux***, ceux-ci sont exclusivement utilisés pour la centrifugation en gradient. Le gradient et l'échantillon sont amenés dans la

chambre du rotor à l'aide d'une pompe et, comme dans le cas des rotors à angle fixe, c'est le gradient qui est réorienté durant la centrifugation avant que l'on introduise l'échantillon une fois le rotor en mouvement. Il existe deux types de rotors zonaux: rotors en vrac et rotors à débit continu. Dans le type de rotor en vrac, l'échantillon traité peut varier de 10 à 200 mL selon le rotor sélectionné. Pour de plus grands volumes, jusqu'à 100 L et plus, on utilise les rotors à débits continu (30-50 mL/min). Ce type de centrifugation n'est recommandé que pour des applications très spécifiques (ex: purification du virus influenza à partir de liquide allantoïdien chez les producteurs de vaccins). D'autres méthodes permettant de réduire le volume de l'échantillon sont à considérer avant de s'aventurer dans la centrifugation zonale; en particulier mentionnons la précipitation ou l'ultrafiltration (voir le Chapitre 6).

Pour clore cette section sur les rotors, mentionnons que la force centrifuge exercée à un point donné du tube est fonction de la vitesse du rotor. Un nomogramme fourni par la compagnie Beckman permet de déterminer la vitesse du rotor ou la force centrifuge ou la distance radiale lorsque deux facteurs sont connus (*Rotors and tubes for preparative ultr acentrifuges, An operator's manual.* Spinco Division of Beckman. Palo Alto. Ca. 1982. MJM-1182-5-GL).

3.4. TUBES ET RÉCOLTE DES FRACTIONS DE GRADIENTS

On retrouve trois principaux types de tubes pour l'ultracentrifugation: ULTRA-CLEAR™, polyallomère et polycarbonate.

3.4.1. Tubes Ultra-Clear™

Les tubes les plus fréquemment utilisés sont les tubes ULTRA-CLEAR™, faits de thermoplastique à paroi mince; ils remplacent les anciens tubes de nitrocellulose. Ce sont les tubes les plus transparents et ils permettent en certaines occasions de localiser visuellement le matériel dans le gradient. Ces tubes sont à utilisation unique et ne doivent pas être utilisés à des pH >8, ni autoclavés: la stérilisation s'effectue par irradiation ou par l'oxyde d'éthylène. Il est aussi recommandé de les utiliser à des températures comprises entre 4 et 20°C. On trouve deux types de tubes: les tubes standards à parois droites et les tubes Quick-Seal™. Les tubes standards doivent toujours être remplis et bouchonnés pour utilisation dans les rotors à angle fixe. Les tubes des rotors horizontaux doivent être remplis jusqu'à 2-3 mm du bord. Les tubes Quick-Seal sont remplis jusqu'à la base du cou: ne pas utiliser de bouchons, ils sont scellés et l'on fournit des adaptateurs spéciaux. Les tubes ULTRA-CLEAR™ peuvent être perforés pour la récolte des gradients.

3.4.2. Tubes en pollyallomère

Les tubes en polyallomère se composent d'éthylène et de propylène copolymérisés. Ils ont une apparence cireuse et sont réutilisables à moins de déformation évidente résultant de l'autoclavage ou la centrifugation. Ils sont recommandés pour les séparations d'ADN en gradient de chlorure de césium parce que l'ADN n'adhère pas aux parois du tube. Cependant, les tubes de polyallomère ne peuvent être congelés ou centrifugés à des températures inférieures à 2°C car ils peuvent craquer.

Il existe deux types de tubes de polyallomère à parois minces comme dans le cas des tubes ULTRA-CLEAR™: standards et Quick-Seal™. Les tubes standards doivent être complètement remplis et bouchonnés pour centrifugation dans les rotors à angle fixe. Dans le cas des rotors horizontaux ("swinging bucket"), il faut les remplir à 2-3 mm du bord et ne jamais utiliser de bouchons. Les tubes Quick-Seal sont recommandés pour les différents types de rotors, ils doivent être remplis et utilisés avec leur adaptateur. Les tubes standards et Quick-Seal peuvent être perforés pour la récolte des gradients. Les tubes de polyallomère à parois épaisses peuvent être utilisés partiellement remplis avec ou sans bouchon dans les rotors à angle fixe ou horizontaux. Ils ne peuvent cependant être percés pour récolter les fractions.

Tableau 1

Propriétés physiques des milieux de centrifugation les plus utilisés

Nom	Masse moléculaire (Daltons)	Densité maximale g/cm³	Force ionique	Osmolalité à 1.2 g/cm³	Viscosité	Absorp. UV
Sels inorganiques						
Chlorure de césium	168.4	1.88	++++	++++	+	faible
Trifluoroacétate de césium	245.9	2.60	++++	++++	+	faible
Molécules organiques						
Saccharose	342.3	1.30	non-ionique	++++	++++	faible
Ficoll	400 000	1.23	non-ionique	++++	++++	faible
Tartrate de potassium	226.3	1.48	++++	++++	+	faible
Molécules aromatiques iodées						
Nycodenz	821	1.42	non-ionique	iso-osmotique	++	faible
Métrizamide	789	1.46	+	iso-osmotique	++	faible
Rénographine	614	1.45	+	iso-osmotique	++	faible
Silice colloïdale						
Percoll	n.a.[a]	1.13	non-ionique	iso-osmotique	+	faible

[a] non-applicable, le Percoll est composé de particules de silice de 17-30nm

3.4.3. Tubes en polycarbonate

Les tubes en polycarbonate sont des tubes transparents très rigides: ils peuvent être stérilisés à l'autoclave bien que l'on conseille des méthodes plus douces comme l'irradiation ou l'oxyde d'éthylène. Les tubes en polycarbonate ne devraient pas être utilisés avec des solutions à pH>9. En général, on les utilise dans les mêmes conditions que les tubes en polyallomère aux parois épaisses: ils ne peuvent être perforés pour la récolte des gradients.

3.5. RÉCOLTE DES FRACTIONS

La récolte des gradients s'effectue manuellement ou automatiquement par perforation des tubes, à l'aide d'une aiguille. La compagnie Beckman offre un appareil polyvalent pour la perforation et la récolte des gradients (Beckman Universal fraction Recovery System) qui sert à la plupart des applications en virologie (Figure 6). Si l'on désire une plus grande précision, il faut recourir à des systèmes plus sophistiqués de fractionnement automatisé avec mesure volumétrique des fractions, nécessitant une solution dense pour le déplacement du gradient (saccharose 66% ou Fluorinert 1.93 g/cm^3) (Instrumentation Specialties Co., Nebraska, USA)

Lorsque l'on concentre ou purifie des échantillons viraux très concentrés, la visualisation directe de la bande virale est parfois possible et l'on peut directement récolter le virus à l'aide d'une pipette Pasteur insérée directement sous la bande d'intérêt. Dans la plupart des cas cependant, un fractionneur est requis pour la récolte du gradient et l'analyse des fractions. La détection des virus ou de leurs composantes virales peut se faire par spectrophotométrie (UV), par microscopie électronique directe des fractions en coloration négative, par comptage à scintillation lorsque le virus est marqué radioactivement ou encore par réfractométrie, si la densité de flottaison est connue. On peut utiliser aussi des méthodes biologiques pour la détection des virus: infectivité, hémagglutination ou autres activités antigéniques ou biologiques (Davis *et al.* 1969). Les méthodes basées sur l'infectivité en culture de tissus ou chez l'animal sont universelles mais l'opération peut demander jusqu'à une semaine. Habituellement le chercheur désirera des résultats plus rapides. Un bon nombre de virus de différents groupes (adénovirus, poxvirus, herpèsvirus, échovirus, myxovirus, paramyxovirus, coronavirus, togavirus, flavivirus, bunyavirus) peuvent agglutiner les érythrocytes de certains animaux et peuvent ainsi être détectés rapidement par une épreuve d'hémagglutination qui prend environ une heure. La microscopie électronique, lorsque disponible, permet aussi la localisation et l'identification rapide des fractions virales ainsi que l'évaluation du niveau de purification atteint (chapitre 11). Enfin, plusieurs techniques basées sur l'antigénicité complètent la gamme des méthodes pour détecter rapidement les virus: mentionnons les essais immunoenzymatiques, l'immunodiffusion et les essais radioimmunologiques.

Enfin, étant donné que les virus sont des particules fragiles, ils se conservent mieux congelés à –20°C ou moins. Au moment de leur utilisation, on doit les décongeler rapidement à 37°C. Des cycles répétés de congélation et décongélation sont à éviter: il est préférable de congeler les échantillons en aliquots. Pour les virus extrêmement labiles, spécialement les virus enveloppés, il est préférable de les conserver à plus basse température dans un congélateur mécanique (–70°C ou –100°C) ou encore dans l'azote liquide (–195°C).

4. PARAMÈTRES IMPORTANTS

4.1. COEFFICIENT DE SÉDIMENTATION ($S_{20,w}$)

Le taux de sédimentation des particules est exprimé en unités Svedberg, tel que mesuré dans l'eau à 20°C et identifié $S_{20\,w}$, et équivaut à 10^{-13} sec. La vitesse de sédimentation d'une particule est proportionnelle à sa masse: étant donné que cette valeur en secondes est généralement trop faible, elle est arbitrairement multipliée par 1000. On a évalué la vitesse de sédimentation de la plupart des particules virales (voir Tableau 2). La valeur $S_{20,w}$ est particulièrement utile pour prédire les temps de centrifugation et pour la sélection de rotors efficaces.

La détermination précise de la constante de sédimentation s'effectue avec une centrifugeuse analytique, non disponible dans la plupart des laboratoires de virologie où l'on ne retrouve en général que des centrifugeuses préparatives. Toutefois, même avec une centrifugeuse préparative, il est possible d'estimer la valeur $S_{20\,w}$ par extrapolation linéaire avec des marqueurs de sédimentation dont la valeur est connue.

4.2. DENSITÉ DE FLOTTAISON

La densité d'une particule virale réfère à la relation entre la masse de son volume et la masse du même volume d'eau à 4°C et est exprimée en grammes par centimètre cube (g/cm^3). Pour la plupart des virus, la densité a été établie (Tableau 2) et cette valeur est importante dans la sélection du milieu de centrifugation pour la séparation isopycnique (densité de flottaison). Notez que le saccharose et le Ficoll ne permettent pas la centrifugation isopycnique des virus non-enveloppés.

4.3. FACTEURS K ET K'

Ces deux facteurs calculés par le manufacturier pour chacun de ses rotors sont très utiles pour évaluer la performance d'un rotor et établir le temps de centrifugation.

En utilisant la formule:

$$T = \frac{K}{S_{20\,w}}$$

où T est exprimé en heure, K est le facteur d'efficacité du rotor et $S_{20\,w}$ est la constante de sédimentation, il est possible d'estimer en heures le temps requis pour déposer au culot une particule virale, ceci à la vitesse maximale du rotor. On peut aussi déduire de l'équation précédente que plus le facteur K est petit, plus le rotor est efficace pour sédimenter une particule virale.

Le facteur K' est calculé dans des conditions de centrifugation en gradient de densité linéaire (saccharose 5 à 20%) et non dans l'eau seulement comme dans l'estimation du facteur K. Les facteurs K' ont été évalués pour des particules de densité variant de 1.1 à 1.9 g/cm^3. Les valeurs K et K' sont données pour chaque rotor dans le livre d'instruction *Beckman Instruction Manual LR–1M–3 (Rotors and tubes for Beckman preparative ultracentrifuges)*.

4.4. QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR L'ÉCHANTILLON

Avant de centrifuger un échantillon viral en gradient de densité, il convient de mesurer son volume et sa densité car certaines règles sont à respecter pour favoriser la séparation de type analytique. Ainsi la concentration idéale de l'échantillon doit être 1/10 de la concentration initiale du gradient: idéalement, l'échantil-

lon déposé sur un gradient de saccharose 10 à 40% ne doit pas être plus élevé que 1%. Il en va de même pour le volume maximal à appliquer qui se situe à environ 0.05% du volume du tube.

En général, dans le cas des centrifugations préparative, les chercheurs en général surchargent leurs gradients et ont développé des stratégies qui présentent certains avantages. Les lecteurs sont invités à consulter les articles de Arora *et al.* (1973 et 1985) et Trudel et Payment (1980).

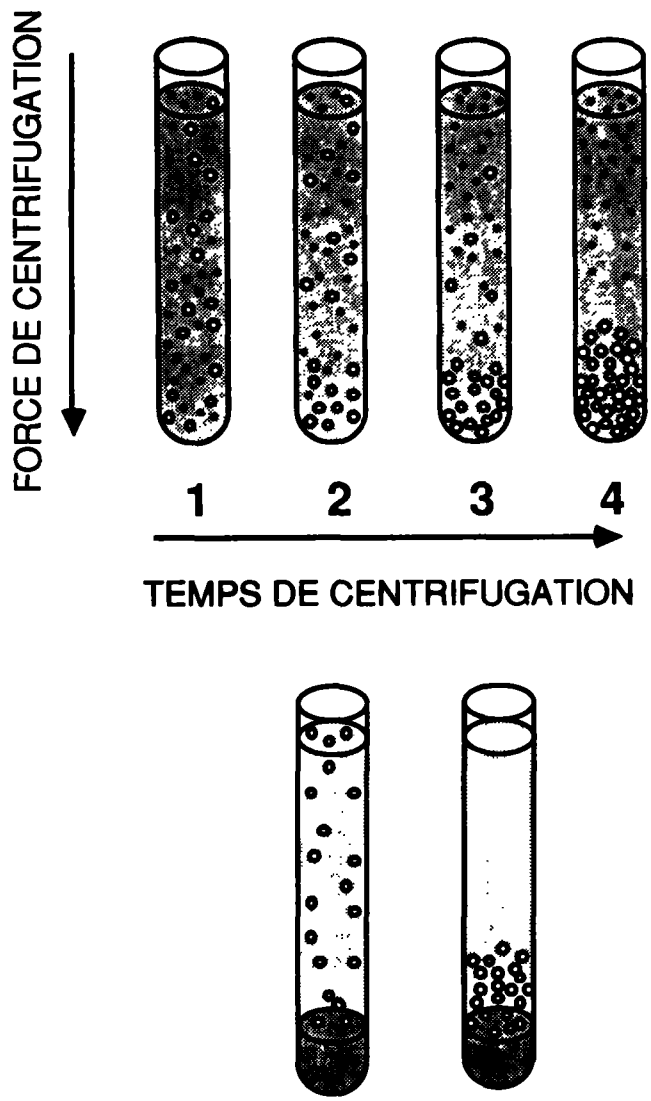


Figure 2

Sédimentation différentielle de particules virales

Selon le temps de centrifugation, on peut déposer au culot les débris et laisser le virus en suspension ou encore déposer le virus au culot (figure du haut). Au lieu de déposer au culot le virus et ainsi risquer de l'endommager, il est possible de centrifuger sur un coussin formé par une solution plus dense que le virus qui est maintenu à sa densité de flottaison à la surface du coussin (figure du bas).

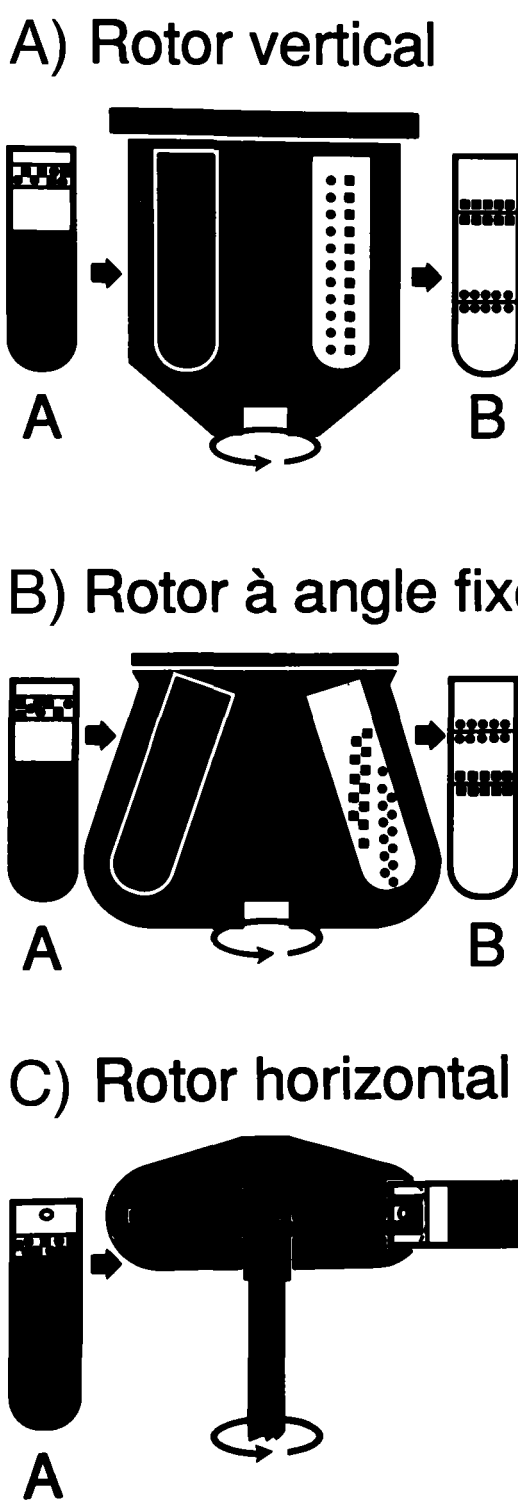


Figure 3

Représentation de la centrifugation en gradient de densité dans différents types de rotors: A) vertical, B) angle fixe et C) horizontal.

A) Dans le cas du rotor vertical le gradient est réorienté durant l'accélération et la décélération: la distance de migration est courte mais relativement efficace, requérant un temps minime de centrifugation. Ces rotors sont beaucoup utilisés pour la centrifugation isopycnique.

B) Dans le cas d'un rotor à angle fixe c'est aussi le gradient qui se réoriente durant la centrifugation: la distance de migration est plus longue permettant une meilleure séparation zonale. Bien qu'utile en gradient de densité, ces rotors sont beaucoup plus utilisés pour la sédimentation au culot ou sur coussin des particules virales.

C) Les rotors horizontaux ("swinging bucket") sont utilisés surtout pour le travail en gradient de densité. Ils permettent d'obtenir d'excellentes séparations vu l'augmentation de la distance de migration: ils sont particulièrement séants pour les centrifugations zonales. Durant la centrifugation c'est le tube qui est réorienté, il n'y a plus déplacement du gradient comme dans le cas des rotors à angle fixe.

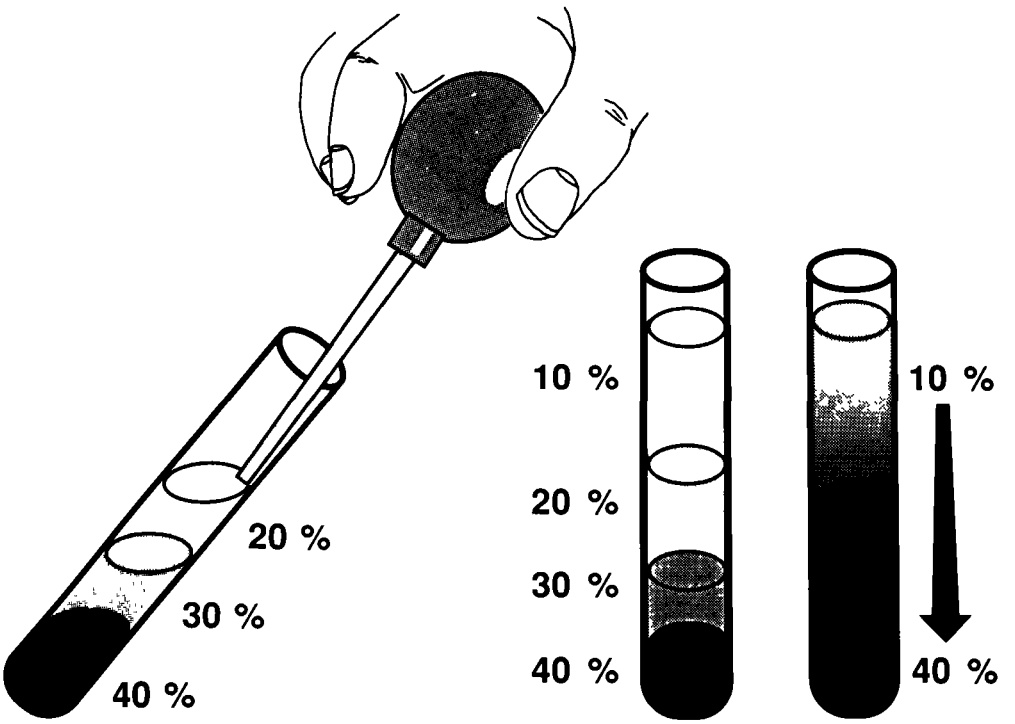


Figure 4

Méthode manuelle de préparation d'un gradient discontinu

La solution la plus dense est déposée au fond du tube à l'aide d'une pipette, puis les autres solutions de densité décroissante sont ajoutées goutte à goutte le long de la paroi de façon à ce que les phases ne se mélangent pas. Lorsque le gradient discontinu est laissé à 4°C durant une nuit, la diffusion permet l'obtention d'un gradient continu. A noter qu'une centrifugation de quelques heures entraîne aussi la formation d'un gradient quasi continu. Cette méthode permet d'éviter l'utilisation d'un formateur de gradient lorsque peu de gradients sont requis.

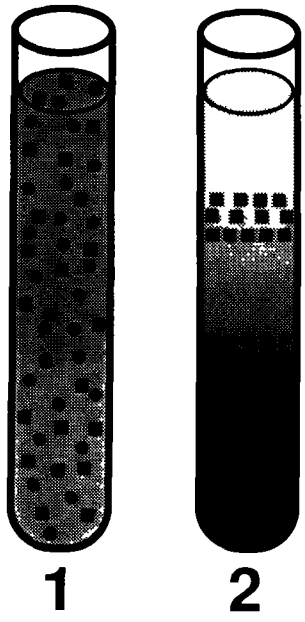


Figure 5

Représentation schématique d'un gradient généré durant la centrifugation

La solution contenant le virus est ajustée à une densité proche de la densité de flottaison du virus. Pendant la centrifugation, le gradient est généré et les particules virales se retrouvent à leur densité de flottaison. Le gradient généré est relativement court et nécessite une longue centrifugation, en général une nuit ou plus. Les milieux de centrifugation pouvant générer un gradient pendant la centrifugation sont le chlorure de césium et le Nycodenz; le Percoll peut aussi généré un gradient métastable étant donné la sédimentation rapide des particules de silice:à noter que le Percoll possède une faible viscosité, ce qui rend les temps de centrifugation très courts (moins d'une heure).

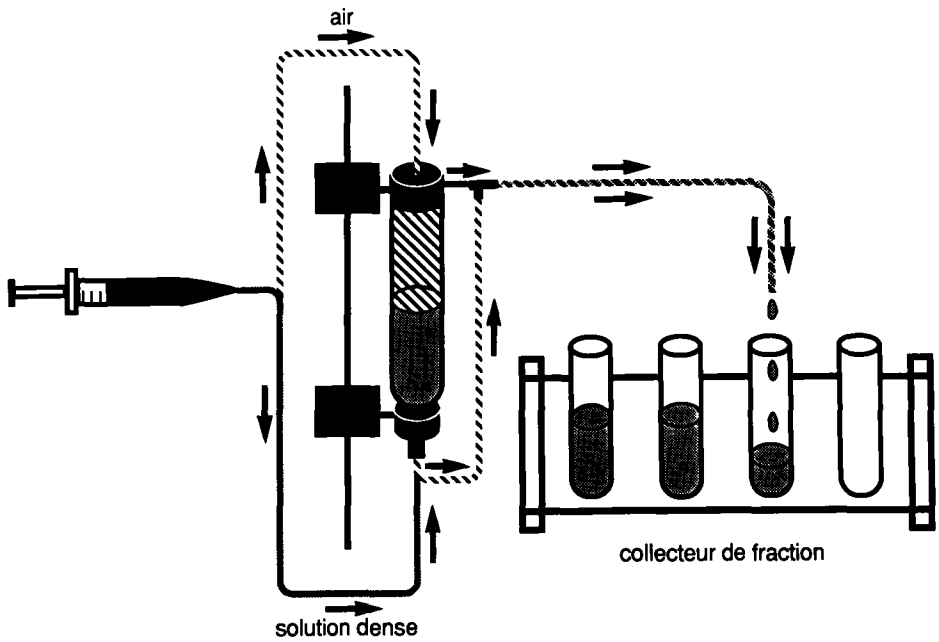


Figure 6

Représentation schématique d'un collecteur de fraction

À l'aide de l'appareil de Beckman (Universal Fraction Recovery System), le tube de centrifugation contenant le gradient est perforé par le fond. A l'aide d'une seringue remplie d'air on applique une légère pression pour faciliter l'égouttement du gradient (traits pointillés) dont les fractions sont récoltées. Il est aussi possible de récolter le gradient par le haut (trait continu): une solution plus dense que la densité maximale du gradient est alors introduite par le fond du tube avec la seringue. Le gradient sort par le haut et les fractions sont récoltées.

Tableau 2

Propriétés physiques des principales familles de virus

Virus A ARN

Famille	Diamètre (nm)	Masse moléculaire Daltons (x 10^6)	Coefficient de sédimentation 10^{-13} sec	Densité g/cm^3	Type
Poxviridés	300-450 x 170-260	-	-	-	Env.
Herpesviridés	120-150	>1000	-	1.26-1.29	Env.
Baculoviridés	40-110 x 200-400	1000	-	1.18-1.25	Env.
Plasmaviridés	80	-	-	1.18	Env.
Iridoviridés	125-130	500-2000	1300-4450	1.16-1.35	Env.
Adénoviridés	70-90	170	-	1.33-1.35	Nus
Papovaviridés	45-55	27-47	240-300	1.32	Nus
Caulimoviridés	50	22.8	208	1.37	Nus
Tectiviridés	65	70	390	1.38	Nus
Corticoviridés	60	50	230	1.28	Nus
Myoviridés	110x80 x 112x16	210	1040	1.49	Nus
Podoviridés	65x17	47	507	1.5	Nus
Microviridés	27	6.7	114	1.4	Nus
Inoviridés	760-1950 x 6	11-23	41-45	1.29	Nus

Tableau 2 (suite)

Propriétés physiques des principales familles de virus

Virus A ADN

Famille	Diamètre (nm)	Masse moléculaire Daltons (x 10^6)	Coefficient de sédimentation 10^{-13} sec	Densité g/cm³	Type
Réoviridés	60-80	65-130	525-550	1.36-1.39	Nus
Togaviridés	40-70	40-70	150-300	1.2	Env.
Flaviviridés	40-50	35-60	150-250	1.2	Env.
Coronaviridés	80-130	-	-	1.18	Env.
Paramyxoviridés	150	500	1000	1.18-1.2	Env.
Orthomyxoviridés	80-120	25	700-800	1.19	Env.
Rhabdoviridés	60 x 180 x 75	300-1000	550-1000	1.17-1.19	Env.
Bunyaviridés	90-100	300-400	350-470	1.2	Env.
Arénaviridés	50-300	-	325-500	1.18	Env.
Rétroviridés	80-100	-	-	1.16-1.18	Env.
Picornaviridés	24-30	8-9	140-165	1.33-1.45	Env.
Cystoviridés	75	100	446	1.27	Env.
Caliciviridés	35-39	15	170-183	1.36-1.39	Nus
Léviviridés	23	3.9	78-82	1.46	Nus

5. RÉFÉRENCES

Arora, D.J.S., Pavilanis, V. et Robert, P. 1973. Two step centrifugation method. A simplification of the density-gradient procedure for the purification of influenza virus. Can. J. Microbiol. 19:633-638.

Arora, D.J.S., Tremblay.P., Bourgault.R. et Boileau.S. 1985. Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid. Anal. Biochem. 144: 189-192.

Birnie, G.D. et Rickwood, D. 1978. *Centrifugal separations in molecular and cell biology.* Butterworths, London, 316pages.

Brakke, M.K. 1951.Density gradient centrifugation: A new separation technique. J. Amer. Chem. Soc. 73: 1847-1848.

Brakke, M.K. 1953. Zonal separation by density gradient centrifugation. Arch. Biochem. Biophys. 45: 275-290.

Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. et Wood, B. 1969. Assays of viruses. *Microbiology,* 5e édition. Harper and Row, New York, pages 1041-1054.

Griffith. O.M. 1986. Techniques of preparative, zonal and continuous flow ultracentrifugation. 5ième édition. Beckman Instruments, Palo Alto, Ca, USA, 50 pages.

Hinton, R et Dobrota, M. 1976. Density gradient centrifugation. *Laboratory technics in biochemistry and molecular biology,* Work, T.S. et Work, E., (Édit.), North Holland Publishing Co., Amsterdam, 290 pages.

Payment, P. et Trudel, M. 1985. Concentration and purification of viruses: p 436-450. *Biotechnology applications and research.* P.N. Chereminisoff et R.P. Ouellette, (Edit.) Technomic Publishing Co. Lancaster, Pa, USA. 699 pages.

Trudel, M., et Payment, P. 1980. Concentration and purification of rubella virus hemagglutinin by hollow-fiber ultrafiltration and sucrose density gradient centrifugation. Can. J. Microbiol. 26: 1334-1339.

9

CHROMATOGRAPHIE POUR L'ISOLEMENT DES VIRUS ET DES PROTÉINES VIRALES

Michel Houde

1. INTRODUCTION

L'étude des virus, que ce soit pour la caractérisation de leurs propriétés structurales, immunologiques, biologiques ou autres, passe d'abord par l'isolement de ce matériel d'étude. La chromatographie permet d'isoler la plupart des virus et leurs composantes d'une manière simple, douce et reproductible. Quelques protocoles plus récents, élaborés par exemple pour l'isolement du virus grippal (Kristiansen *et al.* 1979), du virus Epstein-Barr (Fowler *et al.* 1985), du poliovirus, du virus de la rage (van Wezel *et al.* 1985), des protéines du virus varicella-zoster (Keller *et al.* 1986) et du virus des oreillons (Swoveland 1986), illustrent bien la faveur que rencontrent aujourd'hui les techniques chromatographiques.

La séparation par chromatographie repose d'abord sur le concept essentiel des deux phases: une phase mobile, gazeuse ou liquide, traverse une phase stationnaire, liquide ou solide. Il s'ensuit une migration différentielle où les divers composants initialement présents dans la phase mobile sont sélectivement retenus dans la phase stationnaire. Trois variantes de ce concept sont principalement utilisées lors des séparations chromatographiques réalisées en virologie: la filtration sur gel, la chromatographie sur échangeur d'ions et la chromatographie d'affinité.

2. FILTRATION SUR GEL

La filtration sur gel sépare les particules d'après leur taille. La phase stationnaire se présente sous la forme d'un gel de billes rigides dont la taille des pores est constante (Snyder et Kirkland 1979). Plusieurs diamètres de pores sont disponibles commercialement. À ce sujet, une description détaillée des caractéristiques des différents gels et matrices offrts sur le marché a été réalisée par Janson et Hedman (1982). Les particules de la phase mobile de dimension plus grande que le diamètre des pores, ne pénétreront pas les pores des billes et traverseront très rapidement le gel. Les particules plus petites pourront entrer dans les pores et seront retenues dans la phase stationnaire. Une élution différentielle, proportion-

nelle à la taille et, par conséquent, à la masse moléculaire des particules en présence, pourra donc être obtenue (Figure 1a).

Ce type de chromatographie constitue un outil très valable pour la séparation initiale d'un échantillon inconnu puisqu'il permet un aperçu général de la composition de l'échantillon avec un minimum de manipulation: ainsi cette approche permet une indication rapide de la complexité et de la masse moléculaire des composants de l'échantillon (Snyder et Kirkland 1979). Cette chromatographie a été utilisée par Ward *et al.* (1983) qui ont purifié des fragments de la neuraminidase du virus de la grippe sur colonne de Sephacryl S300. Plusieurs auteurs ont fait le point sur les aspects théoriques et les applications pratiques de la filtration sur gel (Snyder et Kirkland 1979, Janson et Hedman 1982, Yau *et al.* 1979, Yang et Tsao 1982).

3. CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'IONS

La chromatographie sur échangeur d'ions permet la séparation de composantes d'après leur charge ionique intrinsèque. La phase stationnaire est formée d'une matrice possédant des groupements fonctionnels chargés et sur laquelle les particules de la phase mobile pourront être retenues. L'échangeur d'ions, habituellement constitué de particules polymériques poreuses, peut être anionique ou cationique. Le plus souvent, des groupements sulfonates servent à l'échange cationique tandis que l'échange anionique s'accomplit par l'intermédiaire de groupements tri-alkyl-ammonium (Snyder et Kirkland 1979). Dans l'échange anionique, l'échantillon X^- entre en compétition avec l'ion Y^- présent dans le tampon de la phase mobile pour les sites ioniques R^+ disponibles sur la matrice (Snyder et Kirkland 1979). La réaction inverse se produit évidemment dans l'échange cationique. L'élution, qui se fera à l'aide d'un gradient de force ionique (par exemple une concentration croissante ou décroissante de Y^-), produira une désorption graduelle; et la force de la liaison ionique entre les différentes particules X^- de l'échantillon et l'adsorbant R^+ déterminant l'ordre d'élution des particules (Figure 1b).

Les applications virologiques de cette technique se révèlent; à titre d'exemples, nous mentionnerons les travaux d'Omar et Koblet (1985) portant sur la séparation des composantes du virus de la forêt de Semliki et ceux de Vorndam et Trent (1984) rapportant la purification des protéines du virus de l'encéphalite de St-Louis. Un dernier raffinement a été apporté ces dernières années aux techniques de chromatographie sur échangeur d'ions: il s'agit de la chromatographie liquide à haute pression (CLHP ou HPLC en anglais) Nous renvoyons le lecteur intéressé par cette technique aux publications de Snyder et Kirkland (1979) et de Hughes et Wilson (1983).

4. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

La chromatographie d'affinité permet la purification d'une molécule par adsorption spécifique de cette molécule sur un ligand fixé sur une matrice inerte (Figure 1c). Les interactions très sélectives entre enzymes et substrats, antigènes et anticorps ou hormones et récepteurs peuvent être exploitées dans le choix du ligand et conférer à cette technique un facteur de purification très élevé. Ce type de chromatographie étant très utilisé de nos jours (Janson et Hedman 1982), c'est

donc une application virologique de cette technique qui sera décrite en détail dans les sections suivantes.

5. PROTOCOLE

5.1. STRATÉGIE

La technique décrite ici permet l'isolement de la neuraminidase (NA), une glycoprotéine de surface du virus grippal. Certaines modifications à cette technique permettent l'isolement indirect de l'autre glycoprotéine grippale, l'hémagglutinine (HA). Il est par ailleurs évident que ce protocole ne saurait s'appliquer universellement à l'isolement de toutes les protéines virales: chaque système ayant ses exigences bien spécifiques, l'isolement de chaque virus et de chaque protéine virale sous-entend donc la mise au point d'une chromatographie différente.

La première étape est la synthèse du ligand sur lequel s'adsorbera la particule virale à isoler. Ce protocole décrit la synthèse de l'acide N-(para-aminophényl) oxamique (NAPOA), un inhibiteur de NA. Au cours de la seconde étape, ce ligand est couplé à la matrice par activation au bromure de cyanogène (CNBr) afin de constituer l'adsorbant proprement dit. Le virus, après avoir été cultivé et purifié, est soumis à l'action d'un détergent non-ionique, le Nonidet P-40 (NP–40), puis déposé sur la colonne de chromatographie. La NA retenue par le ligand sera finalement éluée par un tampon à pH élevé.

5.2. PRÉPARATION DE L'INHIBITEUR

Le NAPOA est préparé par hydrogénation catalytique de l'acide N-(para-nitrophényl) oxamique, selon la technique mise au point par Cuatrecasas (1973).

1. Le composé (5 g) (Fox Chemicals) est dissous dans 30 mL de diméthylformamide, auquel on ajoute 0.5 g de palladium 10% (p/v) adsorbé sur charbon de bois.

2. La réaction de réduction se poursuit durant 4 h à la température de la pièce sous 40 mm Hg de pression.

3. Le charbon de bois est ensuite séparé du composé réduit par filtration puis ce dernier est lyophilisé, suspendu dans un volume minimal de diméthylformamide et précipité dans l'éther. Le composé est entreposé sous vide à –20°C à l'abri de la lumière.

Certaines exigences spécifiques régissent le choix du ligand (Yang et Tsao 1982):

- la constante de dissociation entre le ligand et la molécule doit être inférieure à 10^{-3} M; il est à noter que cette même constante peut varier selon que le ligand se trouve sous forme libre ou immobilisée sur une matrice

- le ligand doit être bifonctionnel et comporter un site d'affinité et un site d'immobilisation

- ce ligand doit être stable durant la modification chimique.

5.3. PRÉPARATION DE L'ADSORBANT

Le ligand, le NAPOA, doit être couplé par une liaison azo à une matrice faite de billes d'agarose contenant le tripeptide glycyl-glycyl-tyrosine (Gly-Gly-Tyr). Le choix de cette matrice de support est très important. Yang et Tsao (1982) énumèrent cinq propriétés qui sont essentielles à une bonne matrice:

- elle ne doit pas réagir elle-même avec les protéines et doit donc être hydrophile et sans charge intrinsèque
- elle doit avoir de bonnes propriétés mécaniques, qui seront retenues après traitement chimique, pour minimiser le débit et assurer un écoulement uniforme
- elle doit avoir une bonne porosité pour faciliter le passage des macromolécules à l'intérieur de la bille
- le nombre de groupements actifs disponibles doit être suffisant
- elle doit posséder une certaine stabilité mécanique et chimique.

Janson et Hedman (1982) mentionnent également d'autres qualités telles que l'insolubilité, la facilité de dérivatisation, le coût et la réutilisabilité. Quatre principaux types de polymères, tous hydrophiles, sont utilisés: la cellulose, l'agarose, le dextran et le polyacrylamide. L'agarose, à 4%, en billes de 0.1 mm de diamètre (Sepharose 4B), demeure à ce jour la matrice la plus populaire, à cause de sa perméabilité aux macromolécules, de son adsorption non spécifique faible et de sa stabilité chimique.

Le GlyGlyTyr sert ici de bras entre la matrice et le ligand afin de faciliter le couplage, en réduisant les obstructions stériques possibles entre la matrice et la molécule à isoler. Ce bras, qui doit être flexible et mobile, doit avoir une longueur bien précise; trop court, il est inefficace et, trop long, il peut adsorber certaines molécules non spécifiquement. Il est à noter que l'entreposage prolongé (plus d'un an) de GlyGlyTyr ou de tout autre type de bras peut occasionner des problèmes de spécificité.

L'inhibiteur NAPOA est finalement couplé à l'agarose activée. L'adsorbant obtenu peut être entreposé durant un an à 4°C. Cet adsorbant peut être réutilisé fréquemment (jusqu'à une douzaine de fois). Il est préférable cependant de le retirer de la colonne et de le suspendre de nouveau dans du NaCl 0.1 M entre chaque usage; au bout d'une heure, l'adsorbant est redéposé dans la colonne puis lavé avec le tampon de chromatographie.

Méthode

1. Suspendre dans un bécher de 250 mL, 50 mL de Sepharose 4B (Pharmacia) dans de l'eau distillée jusqu'à un volume de 100 mL.
2. Ajouter 12 g de CNBr à la suspension, sous agitation magnétique.
3. Ajuster et maintenir le pH à 11 avec du NaOH 4 M. Lorsque le pH se stabilise (environ 10-15 min), refroidir rapidement à 4°C.
4. Laver la suspension avec 1 L de tampon $NaHCO_3$ 0.2 M, pH 9.5 à 4°C en utilisant un filtre en verre fritté de type grossier.
5. Suspendre l'agarose activée dans 100 mL le même tampon contenant 2 g de GlyGlyTyr.
6. Agiter doucement pendant 16 h à 4°C.
7. Laver l'agarose à 20°C avec 8 L de NaCl 0.1 M (durant 8 h environ). Laver de nouveau après entreposage.
8. Dissoudre 80 mL de NAPOA dans 30 mL de HCl 0.4 M froid.

9. Après 1 min, ajouter 150 mg de nitrite de sodium dissous dans 1 mL d'eau froide.

10. Ajouter 80 mL d'une pâte contenant 30 mL d'agarose-GlyGlyTyr en suspension dans du tampon $NaHCO_3$ 0.5 M, pH 8.9 à 20°C. Ajuster immédiatement le pH à 8.8.

11. Agiter doucement l'adsorbant pendant 8 h à 20°C.

12. Laver l'adsorbant avec 12 L de NaCl 0.1 M (pendant 6–8 h). Laver avec le tampon de chromatographie avant son utilisation.

5.4. SOLUBILISATION DES GLYCOPROTÉINES

Le virus influenza A/URSS/90/77 (H1N1) cultivé sur oeufs embryonnés de poulet de 11 jours est dissocié par traitement au NP–40, puis purifié sur gradient de saccharose (Arora *et al.* 1985). La suspension de protéines virales peut être déposée, si nécessaire, sur un gradient continu de saccharose 5-25% (coussin de 2 mL de saccharose 60%) et centrifugée pendant 16-18 h à 27 000 rpm (rotor SW–27, Beckman) à 4°C (Phelan *et al.* 1980). Comme la HA et la NA migrent dans la même zone du gradient, les fractions contenant à la fois NA et HA sont détectées par un test d'hémagglutination (voir section 5.6), rassemblées et dialysées contre le tampon de chromatographie.

Méthode

1. Suspendre 5–10 mg de virus A/URSS/90/77 (H1N1) dans 1.5 mL de tampon phosphate saline (PBS), pH 7.2, à 20°C.

2. Ajouter 1.5 mL de détergent NP-40 (Sigma) 2% v/v dans du PBS pH 7.2.

3. Incuber 60 min à 20°C. Agiter sur Vortex à toutes les 10-15 min.

4. Ajouter 27 mL de tampon (acétate de sodium 0.05 M, $CaCl_2$ 2 mM, EDTA 0.2 mM, pH 5.5) refroidi à 4°C.

5. Centrifuger la suspension à 30 000 rpm (rotor 50.2Ti, Beckman) durant 60 min, à 4°C.

6. Récupérer le surnageant et répéter l'opération 5.

7. Récupérer le surnageant final.

5.5. CHROMATOGRAPHIE

Placer un volume de 4 mL d'adsorbant Sepharose 4B–GlyGlyTyr–NAPOA dans une colonne de verre (8 x 60 mm). La colonne est ensuite équilibrée à 20°C avec 20 volumes de tampon de chromatographie (contenant 0.1% de NP–40). Ces conditions sont optimales pour l'adsorption de la NA de *Vibrio cholerae*, de *Clostridium perfringens* et du virus grippal (Cuatrecasas 1973).

L'échantillon viral est déposé délicatement sur la colonne. Une ou deux autres colonnes peuvent être rajoutées en série au système. Toutefois, chaque colonne est lavée puis éluée individuellement. Un débit d'environ 1 mL/min doit être recherché. Lorsque l'échantillon (environ 30 mL) est totalement passé dans la colonne, celle-ci est lavée avec du tampon de chromatographie (avec NP-40 0.1%) jusqu'à ce que l'absorbance (à 254 nm) soit revenue au niveau du tampon.

L'élution de la NA se fait avec un tampon contenant du $NaHCO_3$ 0.1 M pH 9.1 (et facultativement, 0.1% de NP–40). Ce tampon accentuera la couleur brune de l'adsorbant. Pour neutraliser l'alcalinité des fractions contenant la NA, on ajoute à

chaque tube de collection, 0.1 mL de tampon acétate de sodium 0.5 M pH 9.1. On recueille des fractions de 1 mL. L'élution se fait jusqu'à ce que l'absorbance (254 nm) revienne au niveau du tampon d'élution. La longueur d'onde de 254 nm est préférable à 280 nm, en raison de l'interférence moindre du NP-40 à cette longueur d'onde.

5.6. ANALYSE DES FRACTIONS

On doit évaluer les fractions récoltées (une fraction sur deux) quant à leurs activités neuraminidasique et hémagglutinante ainsi que leur absorbance (254 nm). Le test d'activité neuraminidasique se fait par évaluation spectrophotométrique de la libération d'acide N-acétyl neuraminique en utilisant la fétuine comme substrat (Aymard-Henry *et al.* 1973). Le test d'hémagglutination se fait par agglutination d'une suspension de globules rouges de coq (0.5% dans du PBS, pH 7.2) (Palmer *et al.* 1975).

On rassemble les fractions d'élution contenant la NA et dépourvues d'activité hémagglutinante. Des billes de polymère Bio–Beads SM-2 (Bio–Rad) sont ajoutées (10% p/v) à la NA pour enlever le NP–40 résiduel. La présence du détergent est mise en évidence par la lecture de l'absorbance à 254 nm (celle-ci devrait revenir à 0.1–0.2). La NA peut être ensuite dialysée, concentrée ou lyophilisée. On peut effectuer une électrophorèse pour évaluer le degré de pureté de la NA.

5.7. TECHNIQUE D'ISOLEMENT DE L'HÉMAGGLUTININE

L'isolement de HA peut également être réalisé avec la colonne d'affinité pour la NA (Phelan *et al.* 1980). L'utilisation de la souche grippale recombinante A/ URSS / 92 /77 (H1) x A/ Prague/ 1/ 56 (N7) permet une meilleure séparation de HA et NA. La centrifugation préalable du matériel viral sur gradient continu de saccharose 5–25% (coussin de saccharose 60%) est cependant indispensable. Le pH du tampon de chromatographie doit aussi être ajusté à 6.8 afin de faciliter la conservation de l'activité hémagglutinante de HA.

6. RÉSULTATS

6.1. ISOLEMENT DE LA NEURAMINIDASE

La figure 2a illustre une chromatographie d'affinité avec le virus A/URSS/ 90/77 (H1N1). Une partie de NA (environ 5%) se retrouve encore avec HA dans la phase de chargement de la colonne mais aucune activité hémagglutinante n'apparaît dans l'éluat. La NA isolée peut représenter de 2 à 4% de la quantité initiale de virus.

6.2. ISOLEMENT DE L'HÉMAGGLUTININE

La Figure 2b montre l'isolement de la HA par chromatographie d'affinité pour la NA. Des rendements de 5 à 7% de HA (par rapport à la quantité initiale de virus) peuvent être obtenus avec cette technique. Par contre l'activité hémagglutinante peut être difficile à conserver.

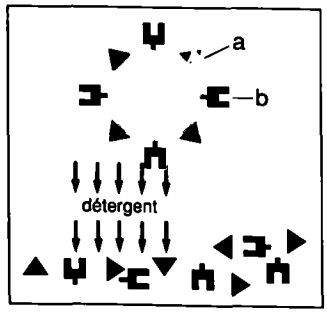
7. CONCLUSIONS

Le protocole illustré dans ces pages ne représente que l'une des nombreuses applications de la chromatographie en virologie. Les applications possibles sont nombreuses car il y a peu de facteurs limitants. Les particules virales peuvent être isolées de presque n'importe quel milieu, la plupart des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des protéines vi-

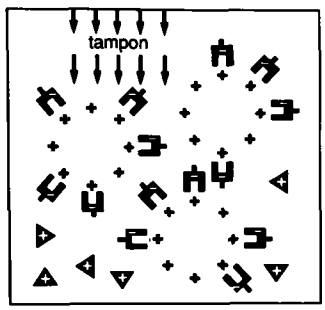
rales (masse moléculaire, charge intrinsèque, activité enzymatique, antigénicité, etc) peuvent être mises à contribution pour isoler la protéine. De plus, la plupart des colonnes chromatographiques peuvent être réutilisées fréquemment.

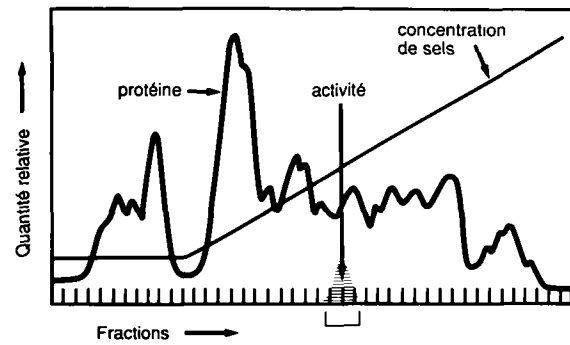
Cette technique comporte aussi certains désavantages. Ainsi, l'isolement des virus et des protéines virales reposant sur leurs propriétés spécifiques, ce fait entraîne la spécificité de chaque système chromatographique, inconvénient qui est moins fréquent en électrophorèse. La présence de contaminants dans l'isolat final peut aussi devenir importante, particulièrement dans le cas de chromatographies moins spécifiques comme la filtration sur gel. Parfois, même la chromatographie d'affinité peut difficilement éliminer les adsorptions non spécifiques qui viennent interférer et contaminer la préparation finale de virus ou de protéines. L'élimination préalable de certains de ces contaminants par centrifugation sur gradient par exemple (ou par une autre chromatographie) doit alors être envisagée. Quoiqu'il en soit, la simplicité des techniques chromatographiques, la vaste gamme des matrices qui sont disponibles sur le marché et la faculté de conservation des activités biologiques des protéines représentent autant d'avantages faisant de la chromatographie l'une des techniques d'isolement les plus attrayantes.

(A) VIRUS

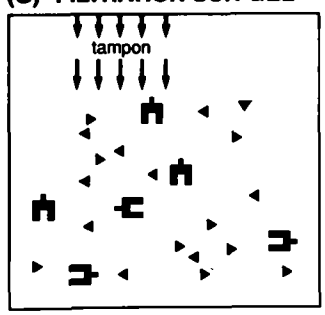


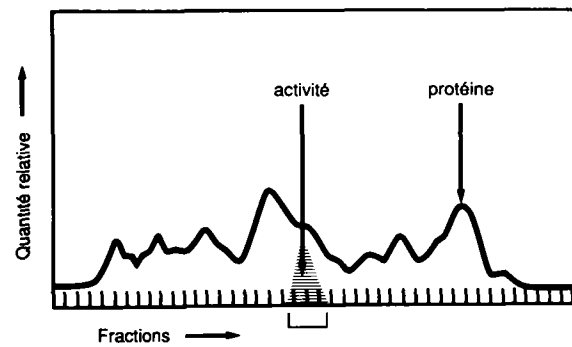
(B) CHROMATOGRAPHIE ÉCHANGEUSE D'IONS



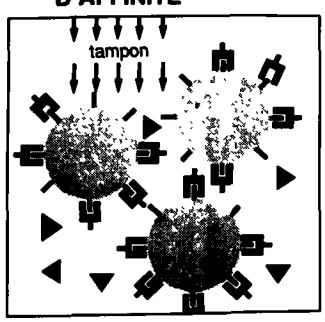


(C) FILTRATION SUR GEL





(D) CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ



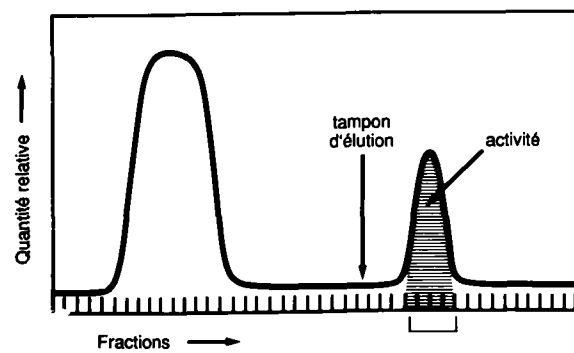


Figure 1

Séparation des protéines par différents types de chromatographie

a) Les protéines *a* et *b* du virus sont solubilisées par un détergent: trois types de chromatographie peuvent servir à la séparation de ces deux protéines.

b) La chromatographie sur échangeurs d'ions permet de séparer les protéines d'après leur charge ionique. La protéine *a*, de charge positive, ne sera pas retenue par la résine qui est aussi de charge positive, et sera éluée rapidement. La protéine *b* de charge négative, sera retenue par la résine tant que la concentration saline du tampon d'élution ne sera pas suffisante pour annuler les forces d'attraction.

c) La filtration sur gel permet de séparer *a* et *b* selon leur taille. La protéine *b* étant plus grosse ne pourra pénétrer les pores des billes et traversera donc rapidement le gel. La protéine *a* sera retardée car elle aura tendance à pénétrer les pores des billes.

d) La chromatographie d'affinité utilise une matrice sur laquelle est fixée un ligand. Le ligand étant spécifique à la protéine *b* , cette protéine se liera au ligand immobilisé et demeurera fixée dans la colonne tant qu'un tampon d'élution approprié ne sera pas passé dans la colonne. La protéine *a* passera sans être retardée.

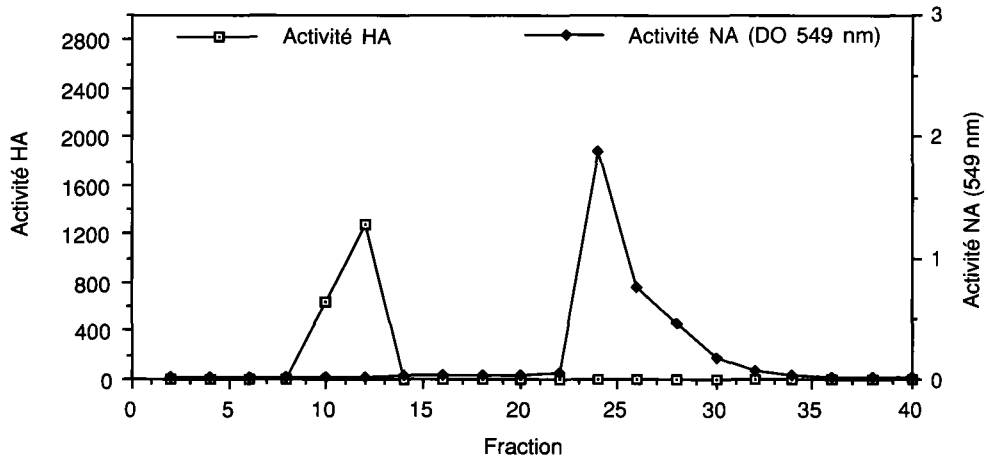


Figure 2a

Chromatographie d'affinité pour la purification de la neuraminidase (NA).

Isolement de la NA par chromatographie d'affinité utilisant le NAPOA comme adsorbant. Le virus A/URSS/90/77 (H1N1) a été traité avec le NP-40, centrifugé au culot puis le surnageant contenant les protéines virales a été déposé sur la colonne de chromatographie. Les fractions d'élution démontrant une activité neuraminidasique supérieure à 0.5 ont été rassemblées pour constituer la fraction purifiée de NA.

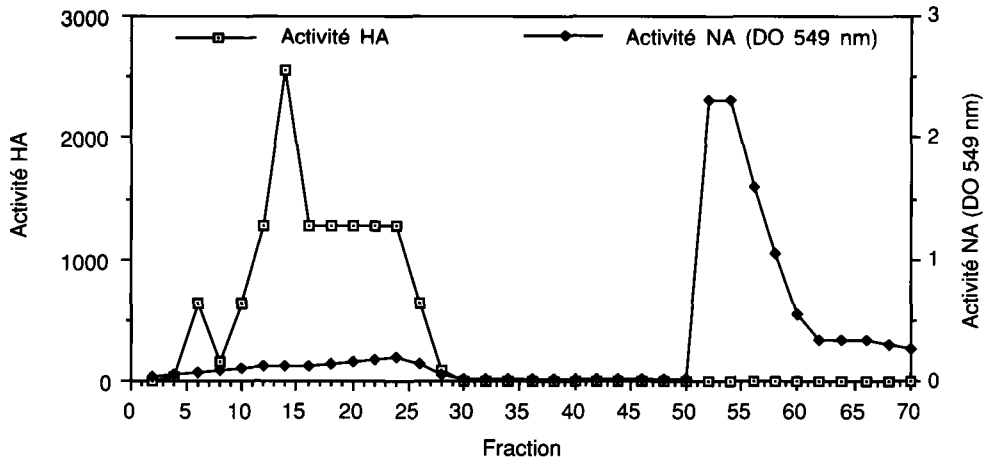


Figure 2b

Isolement de HA par chromatographie d'affinité utilisant le NAPOA comme adsorbant

Le virus A/URSS/92/77 (H1) x A/Prague/1/56 (N7) a été traité avec le NP–40 puis centrifugé sur gradient continu de saccharose 5-25% et un coussin de 60%. Les fractions du gradient démontrant une activité hémagglutinante ont été rassemblées puis dialysées contre le tampon de chromatographie. L'échantillon a ensuite été déposé sur la colonne de chromatographie. Les fractions de chargement ne démontrant aucune activité neuraminidasique significative ont été rassemblées pour constituer le HA. Le tampon d'élution ne contenait pas de NP–40.

8. RÉFÉRENCES

Arora, D.J.S., Tremblay, P., Bourgault, R. et Boileau, S. 1985. Concentration and purification of influenza virus from allantoic fluid. Anal. Biochem. 144: 189-192.

Aymard-Henry, M.M., Coleman, M.T., Dowdle, W.R., Laver, W.G., Schild, G.C. 1973. Influenza virus neuraminidase and neuraminidase-inhibition procedures. Bull. W.H.O. 48: 199-202.

Cuatrecasas, P. 1973. Purification of neuraminidase (sialidase) by affinity chromatography. Meth. Enzymol. 28B: 897-902.

Fowler, E., Raab-Troub, N. et Hester, S. 1985. Purification of biologically active Epstein-Barr virus by affinity chromatography and non-ionic density gradient centrifugation. J. Virol. Meth. 11: 59-74.

Hughes, G.J. et Wilson, K.J. 1983. High-performance liquid chromatography: analytic and preparative applications in protein-structure determination. Meth. Biochem. Anal. 29: 59-135.

Janson, J.-C. et Hedman, P. 1982. Large scale chromatography of proteins. Adv. Biochem. Engineering 25: 43-99.

Keller, P.M., Lonergan, K., Neff, B.J., Morton, D.A. et Ellis, R.W. 1986. Purification of individual Varicella-Zoster virus (VZV) glycoproteins gpI, gpII and gpIII and their antibodies. J. Virol. Meth. 14: 177-188.

Kristiansen, T., Sparrman, M. et Moreno-Lopez, J. 1979. Immobilized lectins for isolation of virus and viral glycoproteins. INSERM 86: 217–230.

Omar, A. et Koblet, H. 1985. One-step separation of the components of Semliki Forest virus by cation exchange chromatography. J. Virol. Meth. 12: 71-83.

Palmer, D.F., Coleman, M.T., Dowdle, W.R. et Schild, G.C. 1975. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology Series No 6, U.S. Department of health, education and welfare, Atlanta, 135 pages.

Phelan, M.A., Mayner, R.E., Bucher, D.J. et Ennis, F.A. 1980. Purification of influenza virus glycoproteins for the preparation and standardization of immunological reagents. J. Biol. Standard. 8: 233-242.

Snyder, L.R. et Kirkland, J.J. 1979. *Introduction to modern liquid chromatography.* 2e Edit. John Wiley and sons, Inc. New York, 863 pages.

Swoveland, P.T. 1986. Isolation of measles virus polypeptides from infected brain tissue by affinity cvhromatography. J. Virol. Meth. 13: 333-341.

Van Wezel, C.W., van Herwaarden, J.A.M. et van de Heuvel-de Rijk, E.W. 1979. Large scale concentration and purification of virus suspension from microcarriers culture for the preparation of inactivated virus vaccines. Develop. Biol. Standard. 42: 65-69.

Vorndam, A.V. et Trent, D.W. 1984. Purification of the structural and non-structural proteins of St-Louis encephalitis virus. J. Virol. Meth. 9: 283-291.

Ward, C.W., Colman, P.M. et Laver, W.G. 1983. FEBS Letters 153: 29-33.

Yang, C.-M. et Tsao, C.T. 1982. Packed-bed adsorption theories and their applications to affinity chromatography. Adv. Biochem. Enginerring 25: 1-42.

Yau, W.W., Kirkland, J.J. et Bly, D.D. 1979. Modern size-exclusion liquid chromatography. dans *Practice of gel permeation and gel filtration chromatography*. John Wiley and sons, Inc. New York, 476 pages.

10

ÉLECTROPHORÈSE DE PROTÉINES VIRALES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

La méthode utilisée la plus couramment pour caractériser le nombre ou la masse moléculaire des protéines virales est sans contredit l'électrophorèse en plaques sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodecyl sulfate). La technique que nous vous proposons est celle de Laemmli (1970) que nous avons légèrement modifiée. Elle tire avantage de l'utilisation de plaques de verre qui permettent l'électrophorèse simultanée de plusieurs échantillons pour fin comparative.

Le principe de base repose sur le fait que le détergent anionique SDS réagit avec les protéines pour former des complexes chargés négativement. Comme la quantité de SDS fixée par chaque protéine est, en général, fonction de la taille de la protéine, la séparation s'effectue sur la base de la masse moléculaire. Le pouvoir de résolution de la technique repose sur l'utilisation d'un gel de regroupement superposé sur un gel de séparation à pH différent. Le gel de regroupement permet de concentrer les protéines virales contenues dans l'échantillon en une mince bande, menant à une meilleure séparation.

Les utilisateurs éventuels sont invités à consulter les livres de Andrews (1981), Gordon (1980), Dunbar (1987) ainsi que le manuel de techniques en biologie moléculaire de Walker (1984).

2. MÉTHODE

2.1. PRÉPARATION DES GELS

Pour la séparation des protéines virales, nous utilisons en général un gel de séparation de 12% (p/v) d'acrylamide avec un rapport acrylamide-méthylène bis–acrylamide de 30:0.8. L'acrylamide est dissous dans un tampon Tris-HCl, pH 8.4 (solution A) et 0.12% de persulfate d'ammonium (solution E).

Le gel de regroupement est constitué de 3% d'acrylamide dans du tampon Tris–HCl 0.125 M, pH 6.8 additionné de 0.1% (p/v) SDS, 0.05% (v/v) TEMED et 0.12% persulfate d'ammonium (solution E).

Le tampon d'électrophorèse est constitué de Tris-HCl 0.025 M, glycine 0.192 M, 0.1% SDS (p/v).

Le gel est coulé entre deux plaques de verre de 18 cm de longueur et 14 cm de largeur, l'épaisseur du gel est de 1.5 mm. Nous utilisons l'appareillage de Bio–Rad (Protean, Bio–Rad, Mississauga, Ont., Canada). D'autres compagnies offrent un appareillage équivalent. Mentionnons, entre autres, Pharmacia (Uppsala, Suède) et Hoefer Scientific (San Francisco, Ca, USA).

Solutions

Solution A

Tris base ..... 36.6 g
SDS ..... 0.8 g
EDTA tétrasodique ..... 1.52 g
TEMED ..... 230 µL

Ajouter 50 mL d'H_2O et ajuster à pH 8.4 avec du HCl 10 N, puis compléter à 100 mL.

Solution B

Tris base (0.5 M) ..... 6.057 g

Ajouter 50 mL d'H_2O et ajuster le pH à 6.8 avec HCl 10 N, puis compléte à 100 mL.

Solution C

Acrylamide ..... 30 g
N.N'-méthylène-bis-acrylamide ..... 0.8 g

Compléter à 100 mL avec H_2O, filtrer et conserver à 4°C, dans une bouteille opaque.

NOTE: TOXICITÉ DE L'ACRYLAMIDE

L'acrylamide est neurotoxique et doit être manipulé avec beaucoup de précautions. Il faut en particulier se laver les mains après la manipulation du monomère et faire attention en pesant la poudre pour ne pas en respirer: le port d'un masque de type chirurgical est recommandé.

Solution D

SDS ..... 10 g

Compléter à 100 mL avec H_2O

Solution E

Persulfate d'ammonium ..... 0.2 g

Compléter à 100 mL avec H_2O. Utiliser toujours une solution fraîche afin d'assurer une polymérisation égale du gel.

Solution F

Bleu de bromophénol ..... 0.05 g

Complétez à 100 mL avec H_2O.

Dans un premier temps, couler le gel de séparation et laisser le polymériser toute la nuit sous une mince couche d'eau distillée pour former une interface parfaitement droite. Le lendemain, enlever le surplus d'eau, couler un gel de regroupement et insérer le peigne pour former les puits. Le gel polymérise en 45 min; enlever le peigne et charger les échantillons dans les puits.

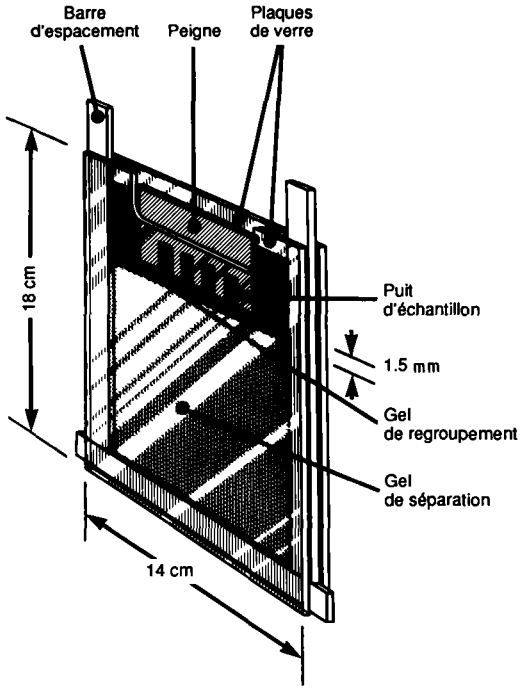


Figure 1

Représentation schématique d'un gel d'électrophorèse en plaques

2.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les protéines de référence utilisées proviennent de chez Bio–Rad: standards de faible masse moléculaire variant de 14 000 à 97 400 et de masse moléculaire élevée de 42 000 à 200 000.

Standards de masse moléculaire

Faible

Lysozyme	14 400
Inhibiteur de trypsine	21 500
Anhydrase carbonique	31 000
Ovalbumine	42 699
Albumine sérique bovine	66 200
Phosphorylase B	97 400

Elevée

Ovalbumine	42 699
Albumine sérique bovine	66 200
Phosphorylase B	97 400
β–galactosidase	116 250
Myosine	200 000

Les échantillons viraux et les protéines servants de marqueurs de masse moléculaire sont dissociés par chauffage à 100°C, pendant 5 min, dans un tampon contenant 0.5% SDS, 2.5 mM EDTA, 2.5% 2-mercaptoéthanol, 5% glycérol et 5 mM Tris-HCl, pH 6.8 et finalement 0.001% de bleu de bromophénol qui servira à identifier le front de migration. Le glycérol sert à donner à l'échantillon la viscosité nécessaire pour empêcher sa diffusion lorsque l'on ajoute le tampon d'électrophorèse.

Il est à noter que pour identifier les complexes de protéines qui seraient reliées par des ponts disulfure, on travaille en conditions non réductrices, c'est-à-dire sans mercaptoéthanol.

2.3. ÉLECTROPHORÈSE

Pour séparer les protéines on applique, à l'aide d'une source de tension, un courant constant de 60 mA. La séparation est arrêtée lorsque le bleu de bromophénol migre à environ 1 cm du bas du gel. Les protéines séparées sur le gel sont ensuite colorées au bleu de Coomassie ou à l'argent (figure 2).

2.4. COLORATION AU BLEU DE COOMASSIE

Le gel est mis en contact durant 60 à 90 min avec une solution constituée de 0.46 g de bleu de Coomassie (Brillant bleu R250, Bio–Rad) dans 400 mL d'une solution contenant 60% d'eau, 30% de méthanol et 10% d'acide acétique. Cette solution, sans le colorant, sert aussi à décolorer le gel pour mettre en évidence les protéines virales. Le temps de décoloration pour la mise en évidence des protéines est d'environ 16 heures sous agitation lente en changeant plusieurs fois de solution pour obtenir une décoloration complète du gel.

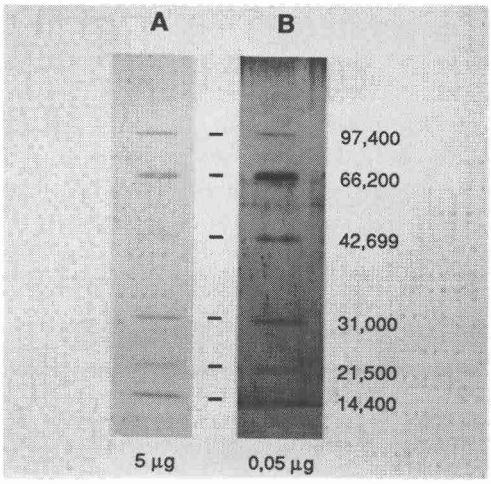


Figure 2

Profil de séparation de protéines de faible masse moléculaire sur gel de polyacrylamide 10% en présence de SDS et en conditions réductrices.

Coloration au bleu de Coomassie (A) ou à l'argent (B) des marqueurs de masse moléculaire suivants: phosphorylase B (97 400), albumine sérique bovine (66 200), ovalbumine (45 699), anhydrase carbonique (21 500) et lysozyme (14 400).

2.5. COLORATION À L'ARGENT

Les protéines virales peuvent aussi être révélées par coloration à l'argent. La méthode que nous utilisons est celle de Merril et al. (1980 et 1982). Il existe aussi d'autres méthodes aussi sensibles en particulier celle de Oakley (1980).

1. Dans un premier temps, les protéines ont été fixées dans une solution contenant 50% de méthanol et 12% d'acide acétique pendant 20 min après que l'excès de SDS ait été enlevé par trois lavages de 10 min dans une solution contenant 10% de méthanol et 5% d'acide acétique.

2. Le gel est mis en contact avec une solution à 3.4 mM de dichromate de potassium et 0.0032 N d'acide nitrique pendant 5 min.

3. Le gel est ensuite soumis à trois lavages de 5 min dans l'eau déionisée et placé dans une solution de nitrate d'argent 12 mM durant 30 min.

4. Cette étape est suivie d'un rinçage rapide à l'eau déionisée puis de 2 rinçages avec la solution de révélateur contenant 0.28 M de carbonate de sodium et 0.5 mL de formol par litre.

5. Le gel est placé dans une solution fraîche de révélateur jusqu'à l'apparition des bandes à l'intensité voulue. La révélation des bandes est arrêtée par immersion dans une solution à 1% d'acide acétique lorsque les bandes montrent l'intensité désirée.

6. Le gel est finalement lavé à l'eau distillée et gardé dans un sac en plastique scellé.

3. DISCUSSION

En général, on travaille avec des gels de 10 ou 12% pour séparer les protéines virales de masse moléculaire variant de 10 000 à 100 000 Daltons. Toutefois, il est préférable en certaines occasions de faire varier la concentration du gel pour séparer des protéines de masse plus élevée ou plus faible: il faut se rappeler alors que la limite de séparation d'un gel à 30% est d'environ 1 000 Daltons et que la limite pour un gel de 3% est de 1 000 000 Daltons. Pour des protéines ou des complexes de protéines de masse moléculaire plus élevée (>2 000 000), on peut utiliser un gel d'agarose à 0.5%.

Si l'on désire séparer des protéines couvrant un domaine plus vaste de masse moléculaire, il est recommandé d'utiliser un gradient de gel. En général, on utilise un gel de 5 à 20%, quoique la limite supérieure soit de 30%. Dans le gel en gradient, lorsque la concentration en acrylamide augmente, la porosité du gel diminue; durant l'électrophorèse, les protéines migrent jusqu'à ce qu'elles soient bloquées par la faible porosité du gel.

Les conséquences ou avantages du gradient sont triples:

- les protéines contenues dans le front de migration sont entassées et plus retardées que les protéines qui suivent, résultant en une meilleure séparation et entassement des bandes
- le gradient permet de séparer en une seule électrophorèse des protéines couvrant un domaine plus large de masse moléculaire
- les protéines de masse moléculaire rapprochée sont plus susceptibles d'être séparées sur un gradient que sur un gel à concentration fixe.

La présence de l'agent réducteur (2–mercaptoéthanol) réduit chimiquement les ponts disulfure ce qui change la structure moléculaire quaternaire en dissociant les sous-unités, permettant ainsi d'identifier les sous-unités d'une protéine ou encore d'identifier si cette protéine se retrouve à l'état de monomère ou de polymère. Il faut aussi noter que certaines protéines ont des ponts disulfures internes et que l'électrophorèse en conditions réductrices change leur configuration et peut-être leur réactivité avec des anticorps, particulièrement les anticorps monoclonaux. Lorsque l'on désire caractériser les protéines virales, il est recommandé de faire une séparation en conditions réductrices et une séparation en conditions non réductrices.

La coloration au bleu de Coomassie est utilisée pour détecter les protéines à une concentration de 0.1 à 1 μg, tandis que la coloration à l'argent est de vingt à cent fois plus sensible.

L'épaisseur du gel peut varier pour accommoder différents volumes d'échantillon selon le but recherché: analytique ou préparative. L'épaisseur des barres d'espacement (Figure 1) disponibles varie de 0.5 à 3 mm (0.5–0.75; 1–1.5; 3 mm). Le nombre de puits, selon les peignes utilisés, peut varier de 25 à 1 seul pour comparer plusieurs échantillons ou pour travailler en condition préparative pour isoler une protéine d'intérêt (peignes de 25, 20, 15, 10, 5, 3 et 1 puits).

4. RÉFÉRENCES

Andrews, A.T. 1981. *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications*. Clarendon Press, Oxford, 326 pages.

Dunbar, B.S. 1987 *Two-dimensional electrophoresis and immunological techniques*. Plenum Press, N.Y., 372 pages.

Gordon, A.H. 1980. Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. Dans *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. T.S. Work and E. Work Eds, Elsevier/ North Holland Biomedical Press, Amsterdam, 213 pages.

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

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. and Ebert, M.H. 1980. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211: 1437-1438.

Merril,–C.R., Goldman, D. and Van-Keuren, M.L. 1982. Simplified silver protein detection and image enhancement method in polyacrylamide gels. Electrophoresis 3: 17-23.

Oakley, B.R., Kirsh, D.R. and Morris,R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105: 361-363.

Smith, B.J. 1984. SDS Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Meth. Mol. Biol. 1: 41-56.

11

MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Robert Alain, Laurent Berthiaume et Michel Trudel

Le microscope électronique, par son pouvoir de résolution très élevé, est un instrument de choix pour visualiser les détails de structure les plus fins au sujet des virus, atteignant pratiquement leur niveau moléculaire. Cette qualité de résolution est possible grâce à des techniques de coloration indirectes telles que l'imprégnation négative avec des sels de métaux lourds et l'ombrage au platine à haute résolution. La technique de Kleinschmidt qui permettent de visualiser les acides nucléiques est d'ailleurs une application de l'ombrage à haute résolution. Les techniques d'enrobage et de coupes ultra-fines offrent des avantages complémentaires de l'imprégnation négative, tout en présentant une perte au niveau du pouvoir de résolution due à l'épaisseur des coupes et à la difficulté d'une coloration fine des structures. Les techniques d'imprégnation négative permettent de voir les structures virales dans leur intégrité, favorisant une interprétation en trois dimensions des images.

La microscopie électronique a joué un rôle majeur dans le développement de la virologie. La coloration négative, en particulier, a permis la visualisation rapide des particules virales et de leurs sous-unités, formant la base de la classification virale moderne. Combinée à l'utilisation de sérums anti-viraux ou d'anticorps monoclonaux, ces techniques ont permis l'identification de virus apparentés.

1. PRÉPARATION ET FIXATION DU SPÉCIMEN

Parmi les fixateurs utilisés pour la microscopie photonique, seuls un nombre restreint s'emploie en microscopie électronique à cause de la grande résolution demandée. Les mêmes principes de base de fixation et de préservation s'appliquent autant à la microscopie photonique qu'électronique.

Le choix du fixateur est déterminé par:

- la nature du matériel à préserver
- la dimension du spécimen
- l'effet du fixateur sur la substance ou la structure à étudier (i.e. acides nucléiques, graisses, hydrates de carbone, protéines, membranes, etc.)

Une double fixation est préférable à la fixation simple puisque les structures cel-

lulaires ne sont pas toutes préservées par les mêmes solutions.

1.1. SUSPENSIONS CELLULAIRES ET CULTURES DE TISSUS

Pour la fixation des cellules en feuillet, le milieu est remplacé par le fixateur, puis les cellules, après grattage avec un policeman, sont centrifugées à basse vitesse pour former un culot rigide. En ce qui concerne les cellules en suspension sont d'abord centrifugées et, après élimination du surnageant, recouvertes par le fixateur.

La vitesse de centrifugation requise pour former un culot dépend de la nature du spécimen. Pour les cellules, une centrifugation à 1000 x *g* pendant 10 min est satisfaisante. Si le volume est limité, il est possible d'utiliser la micro-centrifugation (Eppendorf ou même Airfuge de Beckman).

Pour les suspensions ne formant pas de culots solides, il suffit de resuspendre les cellules dans une solution d'agar.

Il faut éviter de briser les culots ainsi formés tout le long de la procédure de déshydratation, sauf s'ils sont trop gros. Lors de l'enrobage, les culots sont coupés en petits cubes d'environ 1 mm^3.

1.2. TISSUS HUMAINS OU ANIMAUX

Après un prélèvement de tissus, ceux-ci doivent être fixés très rapidement pour éviter le processus d'autolyse. Il est important de choisir le fixateur adéquat. Les fixateurs aldéhydiques sont les fixateurs de choix. Dès le début, il est préférable de couper le tissu en petits cubes de 1 mm^3 afin d'obtenir une fixation uniforme.

1.3. FIXATION

Les solutions de fixation sont préparées dans des solutions tamponnées dont voici les principales:

Tampon cacodylate

Cacodylate de sodium 0.1 M
pH 7.2

Tampon collidine

2,4,6 triméthylpyridine ..... 2.67 mL

HCl 1N ..... 30 mL

H_2O ..... à 100 mL

Tampon phosphate (formule pour culture de tissus)

NaCl ..... 8.0 g

KCl ..... 0.2 g

$Na_2HPO_4.2H_2O$ ..... 1.15 g

$CaCl_2$ ..... 0.1 g

$MgCl_2.6H_2O$ ..... 0.1 g

H_2O ..... à 1000 mL

Stériliser par filtration sur une membrane de 0.22 µm.

1.3.1. Tétroxide d'osmium (OsO_4)

Ce fixateur est très toxique. Il peut fixer l'épithélium de la cornée. Il doit être utilisé sous une hotte ventilée.

L'OsO4 permet de fixer et de colorer les composants lipidiques. Dans nos laboratoires, nous diluons l'OsO4 dans du tampon collidine à pH 7.4 contenant 5% de saccharose.

1.3.2. Permanganate de potassium

Il s'agit d'une solution de rechange à l'OsO_4, car ce fixateur est insoluble dans les huiles et les gras. Il est un agent oxydant puissant et il doit être utilisé avec soin. Il préserve bien certaines membranes cellulaires et la matrice cellulaire apparaît finement granulaire; cependant les particules cytoplasmiques ayant un contenu élevé en ARN et les myofilaments du muscle strié sont mal conservés. De plus, la fixation des chromosomes n'est pas satisfaisante.

1.3.3. Fixateurs aldéhydiques

Les aldéhydes ne colorent pas les tissus durant la fixation, et certains (l'acroléine et la formaldéhyde) pénètrent les tissus assez rapidement pour fixer de gros spécimens. Certains composants de tissus fixés avec un aldéhyde, par exemple les membranes, sont extraits durant la déshydratation et, habituellement, une fixation aldéhydique primaire est suivie par un traitement au OsO_4, bien que l'acroléine et le glutaraldéhyde donnent une excellente préservation des structures fines lorsqu'elles sont employés seuls.

Les meilleurs systèmes tampons pour les aldéhydes sont les tampons phosphate ou cacodylate. Après la fixation, les spécimens sont conservés dans une solution tampon à 4°C pendant plusieurs mois, sans altération des structures fines.

Le **glutaraldéhyde** est le fixateur de choix pour la microscopie électronique. Il donne une meilleure préservation générale des structures fines et occasionne peu de destruction de l'activité enzymatique (Kay 1965).

Nous utilisons le glutaraldéhyde à une concentration finale de 2.5% dans du tampon cacodylate de pH 6.8 à 7.6. Il est important de vérifier le pH de la solution stock de glutaraldéhyde à 50%. Si son pH est inférieur à 3.5, la qualité de fixation peut être pauvre, à cause d'impuretés ou d'une oxydation. La solution stock peut être purifiée en ajoutant une petite quantité de carbonate de barium. Le précipité ainsi formé est enlevé par centrifugation.

Les spécimens sont fixés, selon leurs grosseurs, de 15 min à 4 h à 4°C avec le fixateur glutaraldéhyde tamponné. Pour les études de structures fines, il est préférable d'utiliser de petits blocs d'environ 1 mm^3 et de les fixer durant 1 à 2 h.

Pour une post-fixation adéquate dans le tétroxide d'osmium, il est essentiel de laver les spécimens dans une solution tampon. Il suffit de faire 3 lavages à intervalles de 15-30 min dans le tampon approprié et d'y laisser les échantillons au moins une nuit avant la fixation secondaire au OsO_4. Il est préférable d'ajouter du saccharose à la solution de lavage afin de maintenir la même osmolalité que le fixateur.

1.4. DÉSHYDRATATION

Le principe de la déshydratation consiste à enlever l'eau du spécimen pour la remplacer par de l'éthanol ou de l'acétone qui, à son tour, sera remplacé par le milieu d'enrobage.

La déshydratation doit être la plus courte possible afin de réduire le rétrécissement et l'extraction des composants tissulaires au minimum. Il suffit d'effectuer plusieurs bains dans la solution déshydratante en débutant par une faible concentration (25%) et en augmentant progressivement jusqu'à l'obtention d'une solution à 100% par des changements à 15-30 min d'intervalle. Il semble que les tissus rétrécissent moins dans l'acétone que dans l'alcool. On utilise l'acétone avec les résines de

polyester (Vestopal) et l'éthanol avec les résines d'époxy (Epon). Avec le SPURR, on peut utiliser l'un ou l'autre.

2. MILIEUX D'ENROBAGE

Les propriétés d'un milieu d'enrobage idéal sont:

- le milieu, avant le durcissement, doit être complètement soluble dans l'éthanol ou l'acétone
- il doit avoir une faible viscosité afin de bien pénétrer le tissu
- il doit durcir uniformément sans rétrécissement ou expansion, de sorte qu'il n'y ait pas de rupture dans le spécimen
- il doit résister au bombardement électronique du microscope.

Aucun milieu d'enrobage ne possède toutes ces qualités.

2.1. ENROBAGE

2.1.1. Résines d'époxy

Avantages
- stable au bombardement électronique
- peu de rétrécissement
- durcissement uniforme

Désavantages
- très visqueux
- compatibilité limitée avec l'éthanol

Araldite
- soluble dans l'éthanol et l'acétone
- peut causer des allergies

Epon
- basse viscosité
- pénétration facile dans le spécimen
- cause parfois du rétrécissement
- parfois difficile à couper

Maraglas
- facile à couper
- résine claire à basse viscosité
- réagit bien avec l'acétone, l'oxyde de propylène , mais pas avec l'éthanol

SPURR
- peu visqueux
- pénétration très rapide dans le spécimen
- soluble dans l'éthanol ou l'acétone
- toxique

2.1.2. Vestopal W

Avantages
- similaires aux résines d'époxy
- durcit uniformément
- aucun dommage dû à la polymérisation
- stable au bombardement électronique
- dure mais se coupe bien

Désavantages
- insoluble dans l'éthanol
- soluble dans l'acétone
- très visqueux
- doit être mélangé à un initiateur, le peroxyde de benzoyl et à un activateur, le naphténate de cobalt pour la polymérisation.

2.1.3. Milieux d'enrobage solubles dans l'eau

Dans certains milieux, miscibles avec l'eau, l'utilisation d'éthanol ou d'acétone pour la déshydratation n'est pas nécessaire, ce qui permet de mieux préserver les structures. La polymérisation peut être achevée au four ou par irradiation aux ultra-violets.

- Gélatine
- Glycol méthacrylate (GMA)
- Aquon (dérivé de l'Epon 812)
- Durcupan (dérivé d'une résine d'époxy miscible avec l'eau)
- Epon 812
- Lowicryl (dérivé acrylique)

2.1.4. Méthacrylates

Avantages
- facile à manipuler
- sans couleur
- basse viscosité
- soluble dans l'éthanol
- forme un bloc dur et transparent

Désavantages
- polymérisation inégale
- instable au bombardement électronique

2.2. EXEMPLE D'ENROBAGE: LE VESTOPAL W

1er jour:

1. Fixer le matériel frais au glutaraldéhyde 2.5% dans du tampon cacodylate ou phosphate (pH 7.2–7.4) refroidi pour un temps variant de 15 min (monocouche cellulaire) à 2 h (petits cubes de tissu).

2. Laver 3 fois avec le tampon cacodylate ou phosphate contenant 3% de saccharose en évitant de briser le culot.

3. Conserver les échantillons dans le tampon de lavage à 4°C, jusqu'à plusieurs mois.

2e jour:

4. Fixer une seconde fois avec du tétroxide d'osmium (1.3% OsO_4 dans du tampon collidine ou phosphate (pH 7.4) contenant 5% de saccharose) pendant 1 à 2 h.

5. Déshydrater le matériel fixé par passages successifs (15-30 min chacun) dans des bains de 25, 50, 75 et 95% d'acétone, puis dans de l'eau distillée et finalement faire deux immersions successives dans l'acétone à 100% pendant 30 min chacune.

6. Immerger le matériel déshydraté dans un mélange contenant 1 partie de résine Vestopal et 1 partie d'acétone.

3e jour:

7. Immerger le matériel pendant 2 h dans deux bains contenant un mélange de Vestopal pur catalysé (Vestopal avec 1% de perbenzoate tertiaire de butyle et 1% de naphténol de cobalt).

8. Couper les échantillons en petits morceaux et les placer au fond d'une capsule BEEM™ et les recouvrir avec le mélange de Vestopal.

9. Effectuer la polymérisation en plaçant les capsules à 60°C pour 40 h.

10. Démouler les échantillons en coupant la capsule.

3. COUPES ULTRA-MINCES

3.1. CRYOTOMIE

Les blocs de spécimens dans les capsules BEEM™ sont d'abord démoulés et la partie contenant le matériel est taillée de façon à former une pyramide. Cette taille primaire peut être faite à la main avec une lame de rasoir ou à l'aide d'un pyramitome.

Les coupes ultra-minces sont ensuite réalisées à l'aide d'un ultramicrotome. L'ultramicrotome effectue des coupes en

faisant passer de façon répétitive le spécimen sur un fin couteau de verre ou de diamant. La vitesse l'avance détermine l'épaisseur de la coupe. Nous ne discuterons pas ici des modèles de microtome, mais nous examinerons certains problèmes. Les principales causes de coupes imparfaites sont les suivantes:

Aucune coupe
- mécanisme d'avance à la fin de sa course
- changement de température ou courant d'air
- manque d'eau dans le puits et empilement sur la lame du couteau

Coupes d'épaisseur variable
- lame du couteau émoussée
- angle de dégagement du couteau négatif
- bloc trop mou (changement de position du bout)
- défaut du microtome

Épaisseur variable et/ou rides sur les coupes
- bloc trop dur
- face du bloc trop grande
- couteau émoussé
- angle de dégagement trop grand
- vitesse de coupe trop élevée

Coupes avec courtes rides
- imperfection du couteau

Lignes parallèles dans le sens de la coupe
- marques dues à un couteau abîmé

Rubans pas droits, ou pas de ruban
- côtés du bloc non parallèles l'un à l'autre
- trop d'eau ou une partie du couteau est sec
- compression des coupes sur une partie de couteau émoussé

Coupes attirées par le bloc et couteau mouillé
- trop de liquide dans le puits
- bloc trop mou
- angle de dégagement trop faible.

3.2. COLORATION DES COUPES

Afin d'augmenter le contraste des composants cellulaires sur les coupes, les spécimens sont colorés à certaines étapes du processus d'enrobage. Une grande partie de la coloration se fait lors de la fixation à l'OsO_4. Un bain à l'acétate d'uranyle peut aussi être rajouté avant les étapes de déshydratation. Mais de façon routinière, la coloration est effectuée directement sur les coupes minces.

Il existe trois principaux colorants: l'acétate d'uranyle, l'hydroxyde de plomb et le citrate de plomb. Les meilleurs résultats sont obtenus en combinant l'acétate d'uranyle avec un colorant au plomb.

3.2.1. Citrate de plomb

Ce contrastant agit principalement sur les ribosomes, les lipides et l'appareil de Golgi (Eastman Kodak Cie 1978). Le citrate de plomb est préparé à partir d'un mélange de nitrate de plomb et de citrate de sodium. Le pH final doit être de 12. Cette solution doit être filtrée avant usage. Le temps de coloration pour le Vestopal est d'environ 5 min. Cette coloration ayant tendance à former des cristaux de plomb, il est important de bien laver la grille d'abord au NaOH 1N, puis à l'eau distillée par la suite.

4. IMPRÉGNATION NÉGATIVE

L'imprégnation négative consiste à mettre un spécimen biologique en présence d'une solution aqueuse d'un sel de métal

lourd. Les ions métalliques, avec leur charge positive, viennent former des liens ioniques avec les charges négatives des macromolécules (protéines, glycoprotéines, acides nucléiques) constituant le spécimen. À cause de leur densité électronique élevée, les ions métalliques empêchent le passage des électrons. Par les électrons traversent facilement les structures du spécimen biologique, de densité électronique beaucoup plus faible, en lui donnant par contraste une image négative sur l'écran. Lorsque le virus a conservé son intégrité structurale, le métal lourd s'adsorbe à sa surface extérieure. Par contre, si le virus est le moindrement endommagé, la solution métallique s'infiltre à l'intérieur et révèle sa structure interne (Figure 1).

Différents métaux lourds donnent de bons résultats. Cependant, on a davantage recours à la technique une solution aqueuse d'acide phosphotungstique (PTA) à 2 ou 3%, dont on ajuste le pH entre 6.0 et 7.4 avec de l'hydroxyde de sodium ou de potassium. Comme autres sels de métaux lourds, mentionnons l'acétate d'uranyle et le silicotungstate de sodium ou de potassium.

4.1. PRÉPARATION DIRECTE SUR GRILLE

Cette technique peut s'appliquer à toute suspension virale aqueuse suffisamment concentrée (plus de 10^7 particules/ mL) et ne contenant pas des concentrations excessives de macromolécules ou de sels minéraux. En effet, ces substances interfèrent avec la qualité de l'observation et l'on doit utiliser une technique qui permet de diminuer leurs effets négatifs. Cette technique consiste à imprégner la structure virale de phosphotungstate, lequel fait ressortir celle-ci en clair sur fond noir lors de l'observation au microscope électronique.

1. Tenir une grille de cuivre, recouverte d'une membrane de Formvar et de carbone, et coincée au moyen d'une fine pince d'horloger (pince Dumont #3 ou 4). Un anneau de caoutchouc peut servir à tenir la pince fermée.

2. Déposersur la surface de la grille une goutte de suspension virale au moyen d'une pipette Pasteur ou d'une micropipette.

3. Attendre de 30 à 60 sec, puis assécher la grille au moyen d'un papier buvard.

4. Ajouter une goutte de PTA et laisser imprégner environ 30 sec.

5. Enlever l'excès de liquide sur la grille au moyen d'un morceau de papier buvard en effleurant le bord de la grille.

6. Bien assécher la grille au moyen d'un autre morceau de papier buvard que l'on fait glisser entre les deux tiges de la pince en direction de la grille.

7. Déposer la grille dans un Petri avec un papier filtre au fond, ou dans une boîte porte-grilles appropriée.

8. Procéder à l'examen de la grille au microscope électronique.

Il est également possible de poser le matériel biologique sur la grille par attouchement d'une goutte déposée sur un papier de Parafilm avec la grille. Le liquide adhère automatiquement à la surface de la grille en quantité suffisante.

4.2. CONGÉLATION-DÉCONGÉLATION

Cette technique permet d'obtenir une suspension virale adéquate à partir d'une culture de cellules infectées avec un virus. Les cycles de gel et de dégel font éclater les cellules à cause des cristaux de glace qui se forment et libèrent les particules virales dans la suspension aqueuse.

1. Recueillir les cellules d'un flacon de culture cellulaire (25 cm^2) par grattage avec un policeman de caoutchouc.

2. Centrifuger les cellules à basse vitesse (400 x *g pendant* 10 min, ou 15000 rpm, pendant 30 sec, dans une centrifugeuse Eppendorf).

3. Enlever le surnageant.

4. Soumettre le culot cellulaire à trois cycles de gel-dégel, au moyen de neige carbonique, d'azote liquide ou encore en le plçant dans un congélateur à basse température.

5. Resuspendre les cellules brisées dans un volume minimum d'eau distillée (couleur légèrement opalescente).

6. Procéder à l'imprégnation négative au PTA comme décrit précédemment à la section 4.1.

Les débris cellulaires n'interfèrent habituellement pas avec l'observation ou l'identification des particules virales lorsque la suspension est diluée adéquatement. Le matériel biologique sur la grille est sufisamment dispersé pour permettre une distinction entre les particules virales et toute autre structure.

4.3. OSMOLYSE

Cette technique permet également d'obtenir une suspension virale adéquate à partir d'une culture de cellules infectées avec un virus. La suspension de cellules dans un milieu hypotonique, tel que l'eau distillée, produit un choc osmotique qui les fait éclater et libère les particules virales dans la phase liquide.

1. Recueillir les cellules d'un flacon de culture cellulaire (25 cm^2) par grattage avec un policeman de caoutchouc.

2. Centrifuger les cellules à basse vitesse (400 *g* 10 min, ou 15000 rpm, pendant 30 sec, dans une centrifugeuse Eppendorf).

3. Enlever complètement le surnageant. **Il est important de bien laisser égoutter le tube de centrifugation en le mettant à l'envers sur un papier buvard.**

4. Déposer dans le tube une goutte d'eau distillée (environ 25 µL) et agiter légèrement pour remettre les cellules en suspension.

5. Laisser reposer quelques secondes.

6. Procéder à l'imprégnation négative au PTA comme décrit précédemment.

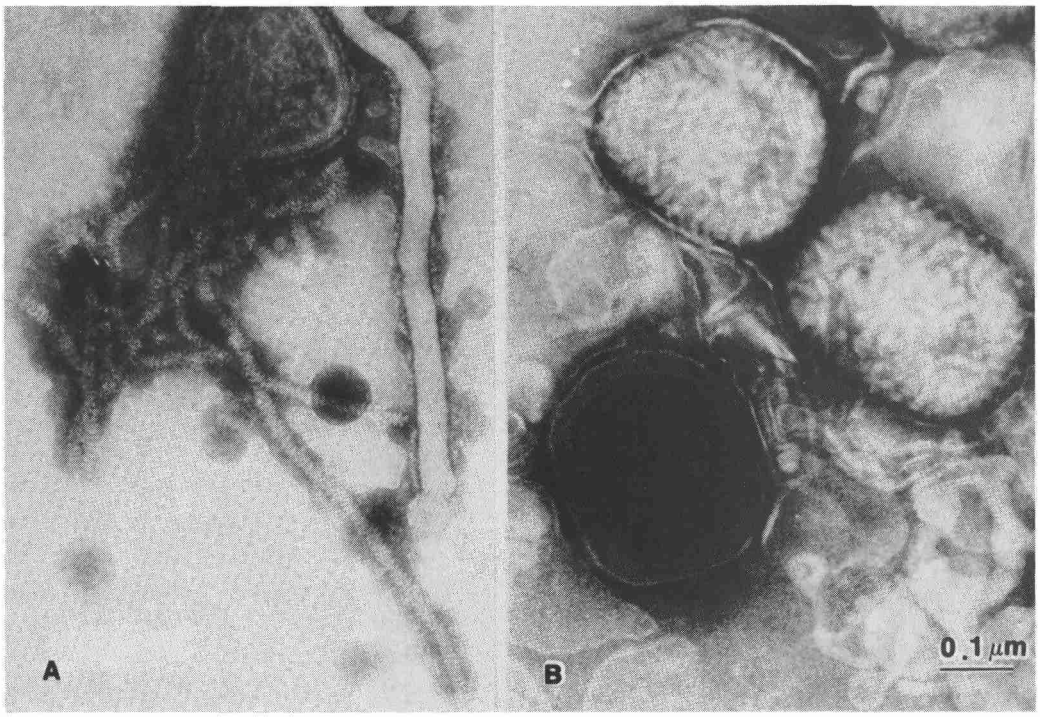


Figure 1

Particules virales observées en microscopie électronique après imprégnation négative à l'acide phosphotungstique 3%. Virion et nucléocapsides du virus parainfluenza (A) et virions du poxvirus (B).

4.4. CONCENTRATION SUR GÉLOSE

Cette technique permet de concentrer le virus directement sur la grille à partir d'une suspension virale contenant peu de virus, tout en minimisant le bruit de fond causé par les sels minéraux. Elle est particulièrement utile lorsqu'on ne dispose que de surnageants de cultures cellulaires ou de liquides biologiques contenant peu de virus, tels que le liquide céphalo-rachidien et l'urine.

1. Faire une solution d'agar noble 1% et la répartir dans les puits à fond rond d'un plateau de microtitrage en chlorure de polyvinyle flexible, (environ 250 µL/puits), et laisser le gel se former. Les plateaux préparés peuvent être conservés à 4°C un certain temps, si on les recouvre d'un plastique adhésif.

2. Déposer un aliquot de la suspension virale (50 à 100 µL) dans un puit avec gélose.

3. Déposer une grille à la surface du liquide, avec la membrane de Formvar tournée vers le bas.

4. Laisser le liquide diffuser complètement dans la gélose (environ 15 à 30 min), puis retirer la grille.

5. Procéder à l'imprégnation négative au PTA tel que décrit précédemment.

On peut également déposer la grille à la surface de la gélose, au fond de la phase liquide, avec la membrane de Formvar tournée vers le haut, le temps de la diffusion (Anderson et Doane 1972).

4.5. VIRUS PURIFIÉ

Cette technique permet d'effectuer un étalement adéquat, ainsi qu'une coloration uniforme lorsque la préparation virale est purifiée. Le phosphotungstate, lorsqu'utilisé seul, adhère difficilement à la grille de formvar en raison d'une certaine hydrophobicité. La présence de macromolécules avec des groupements polaires est nécessaire pour permettre un meilleur étalement de l'agent contrastant. Alors que les préparations virales grossières (spécimens biologiques et préparations cellulaires) contiennent suffisamment de protéines pour permettre au PTA d'adhérer à la grille, le virus purifié est normalement exempt de celles-ci et donne des colorations de piètre qualité.

On peut compenser en ajoutant à la suspension virale ou au PTA une concentration adéquate de substances polaires. Il est également possible de rendre les grilles hydrophiles en les chargeant positivement, c'est-à-dire en soumettant ces dernières, fraîchement recouvertes de carbone, à un rayonnement par haut voltage ("glow discharge") sous un vide partiel en présence d'air ou de vapeurs d'amylamine (Dubochet *et al.* 1971).

La surface du film support (membranes de formvar et de carbone) peut être aussi modifiée par l'addition d'un composé peptidique à la suspension virale, rendant ainsi la grille plus hydrophile. Il est connu que les suspensions virales contenant des protéines font de très belles grilles. On peut utiliser l'albumine sérique bovine (0.005% à 0.05%) ou la bacitracine (50 µg/mL) (Hayat 1986).

Il est aussi possible de centrifuger le matériel peu adhérant directement sur la grille, soit dans un tube Eppendorf dans le cas d'un échantillon légèrement concentré, soit dans un microtube de centrifugeuse Airfuge (voir section 4.6). Après centrifugation, les grilles contenant le matériel viral sont lavées par passage sur gouttes d'eau distillée, pour les débarrasser des sels minéraux ou des sucres et colorées négativement selon la procédure normale.

4.6. MICRO-ULTRA-CENTRIFUGATION

L'ultracentrifugation directe de particules virales sur des grilles échantillons a déjà été rapportée par Gelderblom *et al.* (1978) et Hammond *et al.* (1981), utilisant la micro-ultracentrifugeuse à air de Beckman (Airfuge) et le rotor spécial EM–90 (Miller 1981) développé pour compter le nombre de particules en microscopie électronique. Cette centrifugeuse utilise aussi des mini-rotors à angle fixe (18° et 30°) dont les tubes ont une capacité respective de 180 et 240 µL. Ces mini-rotors ont un facteur d'efficacité K = 12 et 19 à vitesse maximale (30 psi: 95 000 rpm). Avec de tels facteurs d'efficacité, la plupart des virus sont déposés sur la grille en moins de 5 min. La société fabrique aussi un rotor en vrac de 7 mL en plus du rotor pour microscopie électronique (EM–90).

La préparation rapide d'échantillons viraux pour la microscopie électronique est basée sur l'utilisation des rotors à angle fixe, leur facilité de manipulation et la distortion minimum des grilles. Selon notre expérience le rotor EM–90 est plus difficile à manipuler et en plusieurs occasions l'échantillon s'est infiltré entre le joint des parties internes du rotor durant la centrifugation.

Méthode

1. Déposer des aliquots de 50 à 100 µL d'échantillon viral dans des tubes de proprionate de cellulose de 240 µL (rotor A–100, 30° Beckman).

2. Avec une paire de pince fine, insérer une grille de microscopie électronique au fond de la suspension dans le microtube.

3. Centrifuger durant 5 min à 20 psi (120 000 x *g*).

N.B.: les tubes doivent être balancés dans le rotor.

4. Enlever le surnageant à l'aide d'une micropipette.

5. Récupérer la grille échantillon avec une paire de pince.

6. Laver la grille par trois passages successifs sur des gouttes d'eau distillée.

7. Assécher complètement à l'aide d'un papier buvard.

8. Colorer au PTA 3%, pH 6, et sécher à l'aide d'un papier buvard.

La technique de micro-ultracentrifugation directe des échantillons viraux peut être utilisée aussi bien pour les études ultrastructurales des virus ou de leurs sous-unités (Alain *et al.* 1987) que pour le diagnostique (Yin-Murphy *et al.* 1985, Hammond *et al.* 1981).

La distribution des particules sur la grille, après micro-ultracentrifugation, montre une concentration légèrement plus élevée au centre de la grille. D'autre part, pour éviter que beaucoup de débris cellulaires masquent les particules virales, nous suggérons une préclarification des échantillons par centrifugation à 15 000 rpm durant 5 min dans une centrifugeuse Eppendorf.

Nous recommandons tout particulièrement cette technique pour la préparation de fractions virales provenant de gradients de densité, des surnageants de cultures virales ou tout autre échantillon clinique contenant peu de matériel viral. La technique est rapide et simple. Elle permet d'accroître la sensibilité et d'obtenir, entre autre, un matériel de gradient propre, sans perte importante de particules virales, avec un excellent contraste.

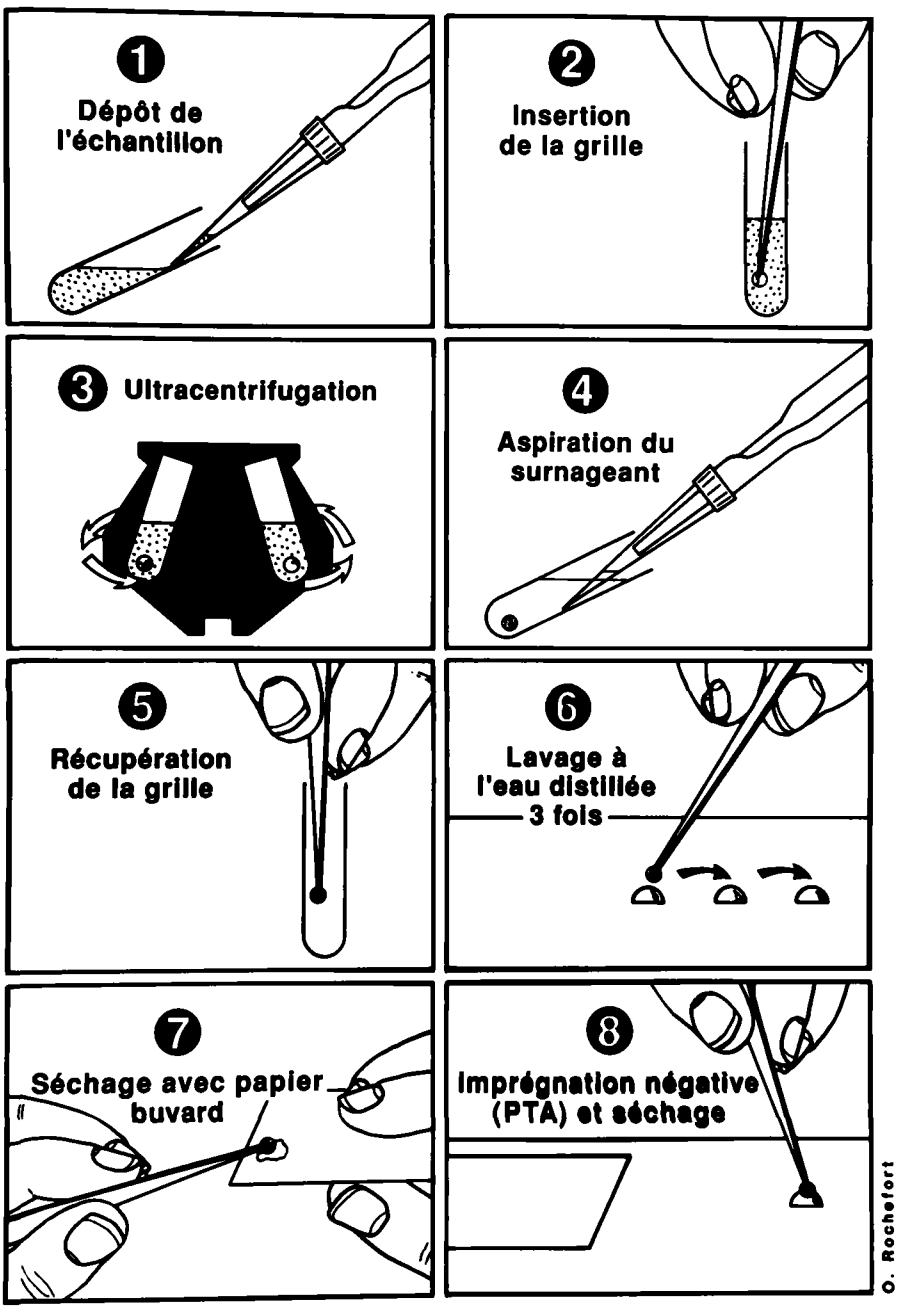


Figure 2

Préparation d'échantillons pour la microscopie électronique par micro-ultracentrifugation (AIRFUGE)

5. RÉFÉRENCES

–, *Eastman Products for Electron Microscopy*. 1978. Eastman Kodak Company, Rochester, NY, 9 pages.

Alain, R., Nadon, F., Séguin, C., Payment, P. et Trudel, M. 1987. Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. J. Virol. Meths 16: 209-216

Anderson, N. et Doane, F.W. 1972. Microscopic detection of adventitious viruses in cell cultures. Can. J. Microbiol. 18: 299-304.

Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger.M. et Kellenberg, E. 1971. A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. J. Ultrastruct. Res. 35: 147.

Gelderblom, H., Reupke, H et Warring, R. 1978. Uber den einzatz der Airfuge in der elektronen-mikroskopichen virus diagnostik. GIT Fachz. Lab. 22: 17-19.

Hammond, G.W., Hazelton, P.R., Chuang, I. et Klisko, B. 1981. Improved detection of viruses by electron microscopy after direct ultracentrifuge preparation of specimens. J. Clin. Microbiol. 14: 210-221.

Hayat, M.A. 1986. *Basic Technics for Transmission Electron Microscopy*. Academic Press Inc., Orlando, Floride, USA., 411 pages.

Kay, H.D. 1965. *Techniques for Electron Microscopy*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 60 pages

Miller, M.F.. *Use of the Airfuge EM-90 electron microscopy rotor in viral research*. Bulletin technique Beckman DS-558.

Yin-Murphy, Rahim, N.A., Phoon, M.C., Baharuddin-Ishak, I. et Howe, J. 1985. Early and rapid diagnosis of acute haemorragic conjunctivis with tear specimens. Bull. WHO 63: 705-709

12

SÉROLOGIE

Pierre Payment et Michel Trudel

1. MATÉRIEL POUR LES MICROTECHNIQUES

1.1. PLATEAUX

Les plateaux (aussi appelés microcabarets) utilisés en sérologie ont 96 cupules faites d'un plastique flexible ou rigide et réparties en huit rangées de 12 cupules. Chaque cupule peut contenir jusqu'à 200 µL de liquide. Les cupules peuvent avoir un fond rond ou conique. Les microcabarets avec cupules à fond rond sont préférés par certains pour les réactions d'hémagglutination et d'inhibition de l'hémagglutination. Des plateaux semblables sont utilisés en culture de cellules, mais ils ont alors un fond plat et sont stériles.

1.2. PIPETTES CALIBRÉES

La distribution de petits volumes de solution peut être faite avec des micropipettes à volumes fixes ou variables (Oxford, Pipetman, etc.) ou avec des micropipettes à réservoir de 25 ou 50 µL. Ces dernières sont en polypropylène, contiennent environ 6 mL de liquide, et peuvent distribuer des gouttes de 25 ou 50 µL. Elles sont munies d'une poire en caoutchouc pour la succion et la distribution du liquide. Pour distribuer précisément leur contenu, elles doivent être maintenues en position verticale lors de la répartition du liquide. Les micropipettes à volumes variables ou fixes sont équipées d'embouts qui doivent être en polypropylène s'ils doivent être stérilisés. On pourra aussi les acheter pré-stérilisés.

Il existe aussi sur le marché des micropipettes à canaux multiples (8 ou 12) qui sont très utiles pour effectuer des dilutions sériées ou encore pour distribuer des volumes répétitifs de solutions.

1.3. MICRODILUTEURS

Grâce aux fenêtres que possèdent leur leur partie inférieure, ces diluteurs en acier inoxydable au titane peuvent retenir un volume calibré de liquide et le transférer. Ils sont disponibles pour des volumes de 25 et 50 µL.

1.4. VÉRIFICATION DES MICROPIPETTES

Afin de vérifier si les fourchettes à dilution ou les micropipettes sont exactes, les fabricants fournissent des buvards de 67 cercles (25 µL) ou 40 cercles (50 µL). En déposant une goutte au centre du cercle

approprié, ou en touchant le centre du cercle avec la fourchettte, on détermine la précision du volume distribué: la zone mouillée ne doit ni dépasser ni incomplètement remplir le cercle. Un autre moyen consiste à utiliser une balance de précision (±0.001 g) et à peser le volume d'eau distribué.

1.5. SUPPORTS À PLATEAUX

Ces supports en aluminiun sont utilisés dans plusieurs centrifugeuses dont le modèle IEC PR–2. Le modèle courant supporte un seul plateau alors que d'autres en supportent jusqu'à cinq. Ces supports sont utilisés pour sédimenter les globules rouges ou les échantillons sur des cellules pour favoriser l'infection.

2. INHIBITION DE L'HÉMADSORPTION

Cette méthode est utilisée pour déterminer le titre en anticorps d'un sérum dirigé contre un virus hémadsorbant. La présence d'anticorps inhibera l'hémadsorption due au virus et permettra d'en évaluer le titre.

1. Chauffer les sérums à 56°C pendant 30 min.

2. Diluer ceux-ci par deux dans un milieu de maintien (MEM-Earle, 2% SFV) dans un plateau pour microculture.

3. Mélanger avec un volume égal de virus hémadsorbant (50 µL de sérum et 50 µL de virus à 100 doses hémadsorbantes, DH_{50}).

4. Incuber 1 h à 37°C (1 h à 25°C ou 16–18 h à 4°C si le virus est très labile).

5. Ajouter les cellules (100 000/mL) dans 50 µL de milieu de maintien.

6. Incuber à 37°C.

Prévoir les témoins suivants:

- virus: 50 µL de milieu et 50 µL de virus à 100 DH_{50}
- sérums: positifs et négatifs dilués de la même façon que les sérums inconnus et incubés avec 100 DH_{50}

7. Lire les résultats après 3 jours. Le titre est exprimé par la dernière dilution provoquant une inhibition de l'hémadsorption (voir Chapitre 3 pour les détails de cette méthode).

3. HÉMAGGLUTINATION

3.1. PRÉPARATION D'ANTIGÈNES HÉMAGGLUTINANTS

Les antigènes hémagglutinants ont trois origines possibles: liquides d'oeufs embryonnés, cerveaux de souriceaux ou cultures cellulaires.

3.1.2. Liquides d'oeufs embryonnés

Les virus respiratoires et les orthomyxovirus en général se développent bien dans l'oeuf embryonné et les liquides vitellin, amniotique ou allantoïde. Tous ces liquides peuvent être utilisés directement comme antigène hémagglutinant. On préférera le liquide allantoïde, plus facile à obtenir en grande quantité (voir la section se rapportant à l'inoculation intra-allantoïdienne). Aucune préparation spéciale n'est requise et l'antigène est utilisé directement ou après une inactivation au formol.

3.1.3. Cerveaux de souriceaux

Cette préparation est surtout utilisée pour les togavirus.

1. Inoculer par voie intracérébrale des souriceaux (1 à 4 jours) suisse.
2. À l'apparition des symtômes spécifiques, tuer les animaux par exsanguination (l'éther et le chloroforme inactiveraient les togavirus).
3. Prélever les cerveaux aseptiquement.
4. Ajouter suffisamment de saccharose à 8.5% (p/v) pour préparer une suspension à 20% (p/v).
5. Homogénéiser dans un appareil électrique (Virtis, Waring Blender ou autre) puis passer au travers d'une aiguille no 18.
6. Mélanger vigoureusement dans 20 volumes d'acétone froid.
7. Décanter l'acétone, ajouter 20 volumes d'acétone froid et mélanger vigoureusement.
8. Laisser 60 min à 4°C.
9. Décanter le surnageant et sécher le sédiment sous vide (1 h).
10. Réhydrater avec de la saline (deux fois le volume des cerveaux).
11. Centrifuger pendant 30 min à 10 000 x *g*.
12. Le surnageant constitue l'antigène.

3.1.4. Cultures cellulaires

Il est possible d'utiliser des cultures cellulaires pour les virus qui produisent une hémagglutinine et un effet cytopathique. On utilisera alors des cellules reconnues comme étant sensibles au virus que l'on traitera par l'une des méthodes suivantes.

3.1.4.1. Congélation - décongélation

1. Infecter la culture cellulaire avec le virus (prévoir une culture semblable non infectée comme témoin).
2. Lorsque l'effet cytopathique a atteint l'ensemble de la culture, récolter séparément les cellules et le surnageant (garder ce dernier).
3. Suspendre les cellules dans 1/10 du volume de milieu de culture.
4. Congeler et décongeler trois fois (–20°C et 37°C).
5. Centrifuger pendant 10 min à 2000 x *g* (4°C).
6. Utiliser le surnageant comme antigène.

3.1.4.2. Concentration des surnageants

Pour une préparation virale ayant un titre hémagglutinant non satisfaisant, les surnageants de cultures infectées peuvent parfois être concentrés. Nous mentionnerons deux méthodes:

3.1.4.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium

1. Ajouter au surnageant de culture, un volume égal de sulfate d'ammonium saturé: ajouter lentement en agitant sans cesse.
2. Laisser 1 h à 4°C.
3. Centrifuger à 2 000 x *g* pendant 20 min.
4. Rejeter le surnageant.

5. Resuspendre le culot dans du PBS à pH 7.4 (1/50 à 1/100 du volume original).

6. Précipiter une seconde fois en amenant à 30% de saturation et resuspendre dans 1/50 ou 1/100 du volume original.

7. Dialyser pendant une nuit à 4°C contre plusieurs litres de PBS.

8. Conserver à –70°C.

3.1.4.2.2. Précipitation au polyéthylène glycol (PEG–6000)

1. Ajouter au surnageant de culture du NaCl cristallisé jusqu'à l'obtention d'une solution à 0.5 M NaCl (29 g /L).

2. Ajouter du PEG-6000 jusqu'à une concentration finale de 7.5% (une solution mère à 50% de PEG est généralement utilisée).

3. Laisser 24 h à 4°C.

4. Centrifuger à 2000 x *g*, pendant 20 min.

5. Resuspendre dans du PBS.

6. Dialyser contre du PBS.

7. Conserver à –70°C.

3.2. TRAITEMENTS POUR DÉMASQUER LES HÉMAGGLUTININES

3.2.1. Extraction alcaline

1. Gratter les cellules de la paroi du flacon pour les suspendre dans le surnageant de culture.

2. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* et à 4°C.

3. Resuspendre les cellules dans 1/20 du volume original de tampon glycine à 1 M pH 10.

4. Agiter 2 h à 25°C.

5. Centrifuger 15 min à 1500 x *g* et à 4°C.

6. Recueillir le surnageant.

7. Reprendre cette extraction trois fois.

8. Titrer chacun des extraits séparément.

9. Conserver à 70°C.

3.2.2. Traitement au Tween 80-Éther

1. Ajouter 0.1 volume de Tween 80 à 1.85%.

2. Agiter 5 min à 4°C.

3. Ajouter 0.5 volume d'éther.

4. Agiter 15 min à 4°C.

5. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* à 4°C.

6. Recueillir la phase aqueuse (phase inférieure).

7. Eliminer l'éther résiduel par barbottage d'air ou d'azote.

8. Conserver à –70°C.

Cette technique peut s'appliquer aux surnageants ou aux cellules suspendues dans du PBS.

3.3. TITRAGE DES HÉMAGGLUTININES

Cette technique a été décrite au Chapitre 3. Nous rapellerons seulement la définition de l'unité hémagglutinante: une unité hémagglutinine est contenue

dans la dernière dilution de l'antigène hémagglutinant complètement les globules rouges dans les conditions optimales.

4. INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Lorsque l'hémagglutinine réagit avec des anticorps spécifiques, elle perd son pouvoir hémagglutinant. Cette réaction est utilisée pour déceler les anticorps spécifiques à certains virus ou encore pour confirmer l'identité d'un virus. Malheusement, les sérums contiennent souvent des substances pouvant agglutiner non spécifiquement les hématies. Ils contiennent aussi des inhibiteurs non spécifiques. Ces deux substances interférantes doivent être éliminées.

4.1. TRAITEMENT DES SÉRUMS

4.1.1. Kaolin acide

Préparation de la suspension de kaolin

1. Placer 25 g de kaolin lavé à l'acide (disponible commercialement) dans 90 mL de PBS.
2. Ajuster à pH 7.2.
3. Laisser déposer 24 h.
4. Retirer le surnageant.
5. Compléter à 100 mL avec du PBS.
6. Ajuster à pH 7.2 avec du NaOH 1N.

Traitement

1. Diluer le sérum 1:5 dans du PBS (0.1 mL-0.4 mL).
2. Ajouter un volume égal de la suspension de kaolin et agiter.
3. Incuber 20 min à 4°C (agiter 2 ou 3 fois).
4. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* à 4°C.
5. Recueillir le surnageant qui correspond à une dilution 1/10 du sérum.

4.1.2. Héparine-chlorure de manganèse

1. Diluer le sérum avec un volume égal (0.1 mL + 0.1 mL) du tampon approprié (DGV, PBS ou autre: voir Chapitre 3, section 4).
2. Ajouter 0.1 mL d'une solution d'héparine (5000 unités/mL) et de $MnCl_2$ 1 M.
3. Mélanger doucement.
4. Incuber 15 min à 4°C.
5. Centrifuger 15 min à 1000 x *g* à 4°C.
6. Recueillir le surnageant qui correspond à une dilution 1:3 du sérum.

4.1.3. Trypsine

1. Ajouter 0.1 mL d'une solution de trypsine (8 mL/mL en tampon phosphate 0.1 M pH 8.2 fraîchement préparée) à 0.2 mL du sérum.
2. Incuber 30 min à 56°C.
3. Utiliser tel quel pour la réaction.

4.1.4. RDE (Receptor Destroying Enzyme)

1. À 0.1 mL de sérum, ajouter 0.4 mL d'une solution de RDE contenant 100 unités/mL.
2. Incuber une nuit à 37°C.
3. Ajouter 0.3 mL de citrate de sodium à 2.5%.

4. Incuber 30 min à 56°C.

5. Ajouter 0.2 mL de PBS (dilution 1/10 du sérum).

4.1.5. Acétone

Cette technique est surtout appliquée à la détection des anticorps contre les togavirus.

1. Mélanger 0.2 mL de sérum à 1.8 mL de saline (0.15 M NaCl).

2. Ajouter 24 mL d'acétone à 4°C.

3. Mélanger doucement puis centrifuger 5 min à 2000 x *g* à 4°C.

4. Rejeter le surnageant.

5. Ajouter 25 mL d'acétone à 4°C et mélanger rigoureusement pour resuspendre le culot.

6. Centrifuger 5 min à 1000 x *g* à 4°C.

7. Rejeter le surnageant.

8. Assécher le culot sous vide.

9. Dissoudre le culot sec dans 2 mL de saline-boratée. Laisser la préparation à 4°C toute la nuit, ce qui facilite la dissolution. La dilution finale du sérum est de 1/10.

4.1.6. Adsorption des agglutinines non spécifiques

1. Préparer une suspension d'hématies à 50%. Choisir, de préférence, le même type d'hématies que celui utilisé pour la réaction d'hémagglutination (voir Chapitre 3).

2. Si le sérum n'a pas été traité pour enlever les inhibiteurs non spécifiques, on doit le diluer 1:2 ou plus.

3. S'il a été traité au kaolin, au RDE ou à l'acétone, mélanger 0.1 mL d'hématies à 50% à 1 mL de sérum dilué. S'il a été traité à la trypsine ou à l'héparine-chlorure de manganèse, mélanger 0.1 mL d'hématies à 50% à 0.3 mL de sérum dilué.

4. Incuber 18 h à 4°C (sauf après un traitement au RDE où une adsorption d'1 h à 4°C est suffisante).

5. Si l'incubation n'a duré qu'une heure, centrifuger 10 min à 1500 x *g*.

6. Utiliser le surnageant.

4.2. LA RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Diluer chaque sérum et ajouter une quantité connue d'antigène viral hémagglutinant. Laisser le mélange en contact pour que la réaction antigène-anticorps prenne place. Ajouter des hématies hémagglutinables par l'antigène viral et laisser en contact à la température et au temps prédéterminés pour obtenir l'hémagglutination. La présence d'anticorps spécifiques sera détectée par l'absence d'hémagglutination. Le titre de ces anticorps est l'équivalent de la dernière dilution inhibant l'hémagglutination.

1. Traiter les sérums pour éliminer les inhibiteurs et les agglutinines non spécifiques.

2. Diluer 25 µL de sérum dans 25 µL du tampon approprié, à l'aide de fourchettes à dilution de 25 µL.

3. Ajouter 25 µL d'antigène à 4 unités HA (UHA)/25 µL. Agiter doucement.

4. Incuber 60 min à 4°C.

5. Ajouter 25 µL d'une suspension d'hématies. Agiter doucement.

6. Incuber 60 min à la température optimale d'hémagglutination.

7. Dans certains cas, par exemple lorsque la réaction est réalisée à 4°C, il est préférable de laisser reposer 15-30 min à la température du laboratoire avant de lire les résultats.

8. Prévoir les témoins suivants:

- *Titrage à rebours*: Antigène non dilué, 1/2, 1/4, 1/8 dans le tampon.

- *Sérums*: Afin de s'assurer de la qualité de l'épreuve, on doit inclure à chaque essai, des sérums négatifs et positifs de titre connu. Ces sérums sont traités de la même façon que les sérums à éprouver. Pour tous les sérums, on doit aussi prévoir des contrôles excluant l'antigène afin de s'assurer de l'efficacité des traitements pour éliminer les inhibiteurs et les agglutinines non spécifiques. La dernière rangée de cupules est réservée à cette fin: elle recevra 25 µL de sérum à sa dilution la plus faible, 25 µL du tampon, après incubation, et 25 µL de globules rouges.

- *Globules rouges*: Prévoir quatre cupules qui ne contiendront que du tampon (50 µL) et des hématies (25 µL).

Avant de commencer l'interprétation des résultats, il est important de vérifier tous les témoins:

- l'antigène ne doit pas titrer moins de 2 ou plus de 8 UHA.

- les sérums ne doivent montrer aucune réaction avec les hématies et les sérums témoins ne doivent pas donner plus d'une dilution de différence avec leur titre indiqué.

- les hématies ne doivent pas montrer d'agglutination non spécifique.

Si tous les témoins sont normaux, lire les résultats: toutes les cupules où il n'y a pas d'agglutination sont considérées comme positives. Le titre du sérum est l'équivalent de la plus haute dilution qui inhibe complètement l'agglutination.

4.3. APPLICATIONS DE LA RÉACTION D'INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION

Les pages qui suivent traitent de l'application de l'IH à plusieurs virus hémagglutinants. La technique utilisée pour le virus de la rubéole est présentée en détail pour en faciliter la compréhension. Dans le cas des autres virus, seuls les détails jugés pertinents sont indiqués.

4.3.1. Virus de la rubéole

Traitement des sérums

1. Mélanger 0.1 mL de sérum à 0.1 mL de DGV.

2. Ajouter 0.1 mL de la solution d'héparine-chlorure de manganèse (c'est-à-dire des volumes égaux d'héparine à 5000 unités/mL et de chlorure et manganèse 1M). Mélanger doucement.

3. Ajouter 0.1 mL d'hématies de coq à 50% dans du tampon DGV. Mélanger doucement.

4. Incuber 18 h à 4°C ou incuber 1 h à 4°C puis centrifuger à 1000 x *g* pendant 15 min.

5. Recueillir le surnageant qui équivaut à une dilution 1/4 du sérum.

Hémagglutniation (HA)
(titrage de l'antigène)

1. Reconstituer l'antigène lyophilisé selon les indications du fournisseur.

2. Laisser l'antigène 15 min à 4°C.

3. Diluer 1/4 (0.1 mL d'antigène-0.3 mL de DGV).

4. Préparer des dilutions par deux (1/4 à 1/2048) dans 25 µL de DGV. Prévoir trois rangées par antigène.

5. Ajouter 25 µL de DGV à toutes les cupules.

6. À toutes les cupules, ajouter 25 µL d'une suspension à 0.25% de globules rouges de poussin de 1-2 jours dans du DGV (lavés trois fois dans du DGV par centrifugation). Agiter doucement.

7. Incuber 1 h à 4°C.

8. Incuber 25 min à la température de la pièce, lire les résultats.

Le titre hémagglutinant de l'antigène rubéole est la dilution la plus élevée provoquant une agglutination complète. Le titre de chacune des trois rangées ne doit pas différer de plus d'une dilution. Si les trois titres sont trop différents, il faut reprendre le titrage. Si deux titres sont similaires, ceux-ci sont considérés comme bons.

L'évaluation du nombre d'unités hémagglutinantes (UHA) se fait de la façon suivante: si le titre de l'antigène est de 1/64, une dilution 1/16 de cet antigène contient 4 UHA; il faut donc diluer 0.1 mL d'antigène reconstitué dans 1.5 mL de DGV.

Inhibition de l'hémagglutination (IH)

1. Diluer les sérums de 1/4 à 1/512 dans 25 µL de DGV avec des fourchettes de 25 µL.

2. Ajouter 25 µL de l'antigène prédilué à 4 UHA dans du DGV. Agiter doucement.

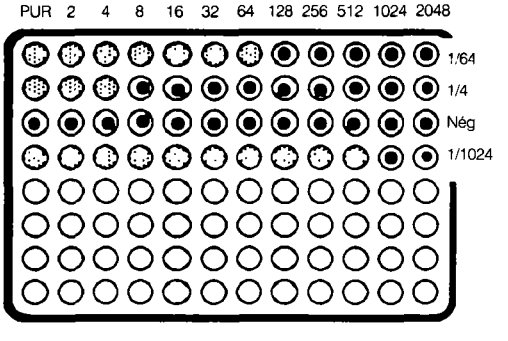
3. Incuber 1 h à 4°C.

4. Ajouter 25 µL de la suspension à 0.25% d'hématies de poussin de 1 jour. Agiter doucement.

5. Incuber 1 h. à 4°C.

6. Incuber 15 min à la température de la pièce.

7. Lire les résultats.



Interprétation

Dès le début de l'éruption cutanée (7 à 10 jours après l'infection), les anticorps IH commencent à être décelables. Le niveau le plus élevé sera atteint 5 à 6 semaines après l'infection et les anticorps persisteront. Si l'on soupçonne une rubéole, on prélèvera un premier sérum dès le contact, puis un deuxième 2 à 3 semaines plus tard. Lorsque deux sérums sont prélevés à 14 jours d'intervalle et que le

titre IH des anticorps est identique, nous procédons à la fixation du complément (FC). Cette activité anticorps apparaît plus tardivement que la précédente. Une augmentation significative du titre FC (c'est-à-dire de quatre fois) signifie une infection récente.

- Pour déterminer si une personne est protégée contre la rubéole, le tittre sérique des anticorps inhibant l'hémagglutination (IH) doit être égal ou supérieur à 1/16.

- Lorsque le titre d'un sérum est négatif ou inférieur à 1/16, il est recommandé de procéder à la vaccination. Toute personne qui reçoit le vaccin devrait fournir un second sérum prélevé 40 jours plus tard afin de vérifier l'immunité induite. Un sérum prélevé trop tôt risque de ne pas accuser d'anticorps spécifiques; le vaccin induit les anticorps plus tardivement que l'infection naturelle.

- La période d'incubation de la maladie étant de 7 à 10 jours avant l'apparition des symptômes cliniques, il est essentiel d'indiquer la date du contact et celle du prélèvement sanguin. Si des symptômes cliniques se manifestent, il est important de préciser la date du début de la maladie.

- Lorsqu'il s'agit d'un cas de contact et que le titre IH du sérum est négatif, il faut procéder à un deuxième prélèvement sanguin à 14 jours d'intervalle. Une augmentation significative du titre IH, c'est-à-dire de quatre fois, signifie une infection récente.

- Si le titre du sérum est positif, ceci indique l'état immunitaire du patient au moment du prélèvement sanguin. Dans le but de déterminer, sur un seul sérum, s'il s'agit d'une immunité acquise récemment ou de longue date, nous procédons à l'isolement des immunoglobulines M (IgM) et à la détermination d'une activité anticorps IH associée aux IgM, un signe d'une infection récente, datant de 30 à 60 jours avant le prélèvement sanguin.

4.3.2. Autres virus

Virus des oreillons

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.
- Traiter au kaolin.
- Traiter avec des hématies de coq à 50% dans du DGV.

Hémagglutination

- Hématies de poussin à 0.5% dans du DGV.
- Tampon DGV (0.025 mL).
- 60 min à 20°C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans le DGV à partir de 1/20 (à la suite du traitement au kaolin et aux hématies).
- Hématies de poussin à 0.5%.
- Antigène à 4 UHA/25 µL.
- 60 min à 20°C.

Virus de la rougeole

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.

- Absorber avec des hématies de singe cercopithèque à 50% (dans PBS ou DGV).

Hémagglutination

- Hématies de singe cercopithèque à 0.5% (lavées trois fois à l'Alsever, resuspendues dans du PBS ou du DGV).
- Tampon PBS pH 7.4 ou DGV pH 7.2.
- 60 min à 20°C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués avec du tampon PBS ou DGV à partir de 1/2.
- Antigène à 4 UHA/25 µL dans du DGV ou du PBS.
- 60 min à 25°C.
- Hématies de singe cercopithèque à 0.5% dans du PBS ou du DGV.

Réovirus

Traitements des sérums

- Inactiver à 56°C pendant 30 min.
- Traiter au kaolin.
- Absorber sur hématies bovines pour le type 3, ou humaines type "O" pour les types 1 et 2.

Hémagglutination

- Hématies bovines à 0.5% dans du PBS (type 3), ou humaines type "O" à 0.5% dans du PBS (type 1 et 2).
- Tampon PBS.
- 60 min (4, 20 ou 37°C).

Inhibition de l'hémagglutination

- Diluer les sérums dans du PBS à partir de 1/20.
- Antigène à 4 UHA dans du PBS.
- Hématies humaines 0.5% ou bovines 0.5% dans du PBS.
- 60 min (4, 20 ou 37°C).

Adénovirus

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.
- Traiter au kaolin.
- Absorber sur hématies de rat ou de singe (selon le groupe hémagglutinant).

Hémagglutination

- **Hématies de rat ou de singe à 0.4% dans du PBS.**
- Tampon PBS.
- 60 min à 20°C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans du PBS à partir de 1/20.
- Antigène à 4 UHA/25 µL.
- 60 min à 20°C.
- Hématies de rat ou de singe à 0.4% dans du PBS.

Entérovirus

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.

- Traiter au kaolin.
- Absorber sur hématies humaines type "O".

Hémagglutination

- Hématies humaines type "O" à 0.4% dans du PBS.
- Tampon PBS.
- 60 min à 4 ou 37°C selon le cas.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans du PBS à partir de 1/20.
- Antigène à 4 UHA/25 µL.
- 60 min à 20°C.
- Hématies humaines type "O" à 0.4%.

Togavirus

Traitement des sérums

- Inactiver 30 min à 56°C.
- Traiter au kaolin ou à l'acétone.
- Adsorber sur hématies de poulet.

Hémagglutination

- Hématies de poussin à 0.4% dans de la saline phosphatée, ajustée au pH optimal pour le virus étudié.
- Tampon: saline phosphatée à pH optimal.
- 60 min à 20 ou 37 °C.

Inhibition de l'hémagglutination

- Sérums dilués dans la saline phosphatée avec albumine.
- Antigènes dilués dans la saline phosphatée à pH optimal.
- Incuber 24 h à 20°C.
- Hématies de poussin 0.4% dans la saline phosphatée à pH optimal.
- 60 min à 20 ou 37°C.

5. SÉRONEUTRALISATION

5.1. DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE D'UNE INFECTION

L'épreuve de neutralisation a pour but de déterminer la quantité d'anticorps dans un sérum ou encore d'identifier un virus. Dans les deux cas, la première étape consiste à incuber ensemble sérum et virus afin de permettre l'inactivation (neutralisation du pouvoir infectieux) du virus par les anticorps spécifiques. Ce mélange, en volume égal, de dilutions sériques et d'une quantité prédéterminée de virus est généralement incubé 30–60 min à 20–37°C. Si le virus est particulièrement labile (sensible à la chaleur, à la lumière, au pH, etc.) cette réaction se fera à 4°C. Après l'incubation, le mélange est ensemencé sur cultures cellulaires sensibles au virus ou encore inoculé à des souriceaux. Après quelques jours, la neutralisation du virus sera évaluée par l'absence de signes cliniques chez le souriceau ou encore l'absence d'effet cytopathique en cultures cellulaires. La comparaison avec les témoins appropriés facilite cette évaluation.

Pour fins de diagnostic sérologique d'une infection récente, on doit avoir une paire de sérums (précoce et tardif) qui seront éprouvés simultanément. L'épreuve de neutralisation sera réalisée en deux étapes:

- un dépistage préliminaire contre plusieurs antigènes avec le sérum tardif
- une confirmation en éprouvant les paires de sérums dont le sérum tardif était positif contre les antigènes trouvés positifs

À titre d'exemple et d'illustration de la technique, nous utiliserons la recherche d'anticorps neutralisants dirigés contre le virus coxsackie.

5.1.1. Épreuve de sélection

1. Diluer stérilement les sérums tardifs à 1/8 dans du milieu de maintien (MEM-Earle 2% SFV).

2. **Déposer 25 µL de cette dilution dans les cupules A à G des rangées 1 à 4.** Répéter avec un second sérum dans les rangées 5 à 8 et un troisième sérum dans les rangées 9 à 12.

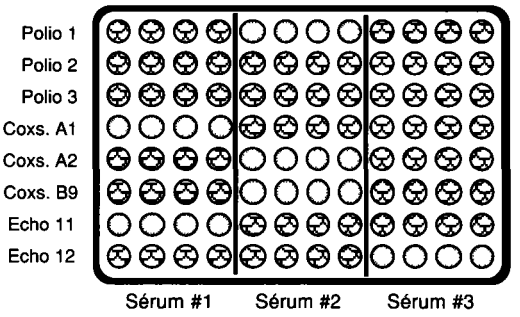
3. Répartir les différents virus à 100 $DICT_{50}$/25 µL à raison de 25 µL/cupule (prévoir sur un autre plateau le titrage de ces virus pour s'assurer d'avoir bien utilisé 100 doses). Ajouter 25 µL de milieu de maintien à la rangée H (témoins sérums).

4. Incuber 60 min à la température de la pièce.

5. Ajouter 100 µL d'une suspension cellulaire sensible aux virus étudiés. Cette suspension sera généralement préparée à 100 000 à 300 000 cellules/ mL.

6. Incuber à 37°C pendant 8 jours.

7. Examiner les cultures après 3, 6 et 8 jours et noter les cultures protégées. Les sérums protégeant deux cupules ou plus d'un virus donné sont positifs.



Épreuve de sélection

5.1.2. Épreuve de neutralisation

1. Sélectionner les sérums et les virus qui se sont révélés positifs au dépistage. Diluer les sérums 1/8 dans du milieu de maintien.

2. À l'aide d'une fourchette à dilution de 25 µL, diluer le sérum, de 1/8 à 1/512. Prévoir quatre cupules par dilution et placer 25 µL du sérum 1/8 dans la rangée 8.

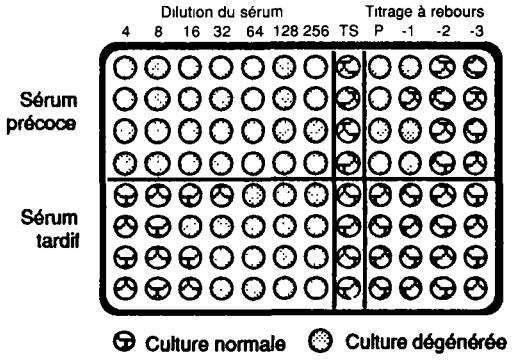
3. À toutes les cupules ayant reçu du sérum (sauf la rangée 8), ajouter 25 µL de virus (100 $DICT_{50}$). À la rangée 8, ajouter 25 µL de milieu de maintien. Ensemencer dans quatre cupules les dilutions 1:10, 1:100, 1:1000 du virus à 100 doses (cupules 9 à 12).

4. Agiter légèrement le plateau, puis incuber 1 h à la température de la pièce.

5. À toutes les cupules, ajouter 100 µL d'une suspension cellulaire appropriée ajustée à 100 000 à 300 000 cellules/mL dans du milieu de maintien.

6. Incuber à 37°C pendant 8 jours. Examiner et lire les résultats après 3, 6 et 8 jours (noter le nombre de cupules dans lesquelles l'effet cytopathique ne se manifeste pas).

7. Evaluer les cultures témoins et le titre du virus qui doit se situer entre 30 et 300 $DICT_{50}$ pour être valide (voir les tables à la fin du Chapitre 3 pour l'évaluation de la $DICT_{50}$ en fonction du nombre de cupules dégénérées ou protégées).



Épreuve de neutralisation

Déterminer le titre des anticorps neutralisants (dose neutralisante 50% ou DN 50%) en appliquant la formule de Kärber. Le titre est exprimé par la dernière dilution du sérum qui neutralise 50% de l'effet cytopathique viral.

La formule de Kärber s'applique directement.

$$DN_{50} = -\Delta - \delta\,(S - 0.5)$$

Δ : dernière dilution protégeant 100% des cultures

δ : écart entre les dilutions en $\log_{10}$ (i.e. $\log_{10} 2 = 0.3$; $\log_{10} 5 = 0.7$)

S : somme des cultures protégées à partir de Δ, chaque cupule ayant une valeur fractionnaire de l'unité

Exemple:

1/16	= 4	=	1.00
1/32	= 3	=	0.75
1/64	= 3	=	0.75
1/128	= 1	=	0.25
	TOTAL		2.75

Donc $-4 - 1\,(2.75 - 0.5) = -6.25$

6.25 en $\log_2 = 80$

pour un titre neutralisant du sérum de 1/80.

6. SÉPARATION DES IMMUNOGLOBULINES EN GRADIENT DE DENSITÉ DE SACCHAROSE

Solutions

Tampon NPE (NaCl-phosphate-EDTA).

NaCl (0.14 M) ..... 8.00 g/L

Na_2HPO_4 (0.008 M) ..... 1.15 g/L

KH_2PO_4 (0.0015 M) ..... 0.20 g/L

EDTA (0.001 M) ..... 0.29 g/L

NaOH 1.0 N ..... ajuster à pH 7.2.

Saccharose (66% p/p)

Saccharose ..... 1710 g

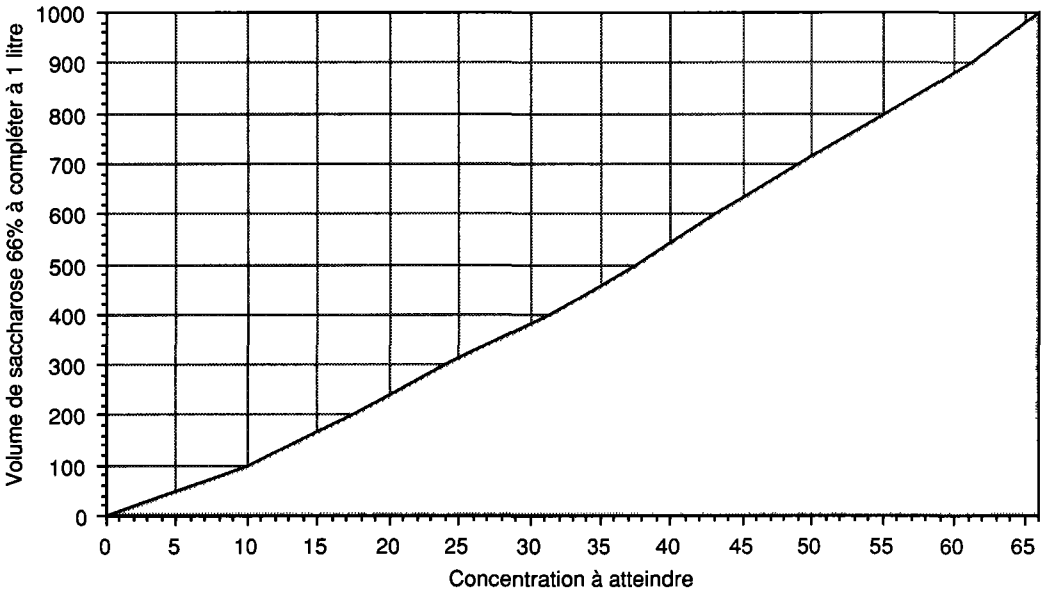
Tampon NPE ..... 990 mL

Cette solution se conserve à 20°C et peut être stérilisée par filtration sur membrane 0.22 µm ou en l'autoclavant pendant 15 min.

Les autres concentrations de saccharose sont préparées par dilution de cette solution mère dans le tampon NPE en utilisant le nomogramme présenté plus loin.

6.1. FORMATION MANUELLE DE GRADIENTS

1. Dans un tube en nitrate de cellulose de 6 mL (rotor SW–50.1 de Beckman) (2" x 0.5"), déposer délicatement et successivement 0.8 mL des solutions suivantes de saccharose: 38, 32, 24, 18 et 12%.
2. Laisser 5 h à 20°C ou une nuit à 4°C. La diffusion transformera le gradient discontinu en un gradient linéaire.
3. Placer 0.5 mL du sérum à séparer sur le gradient (ce sérum aura préalablement été traité aux hématies pour le débarrasser des agglutinines hétérophiles).
4. Centrifuger 16 h à 4°C à 35 000 rpm (rotor SW–50.1).
5. Recueillir des fractions de 10 gouttes en perçant le tube par le fond.
6. Mesurer au réfractomètre à 20°C la concentration en saccharose de chacune des fractions.
7. Mesurer l'activité inhibant l'hémagglutination ou toute autre activité sur chacune des fractions.



6.2. FORMATION AUTOMATIQUE DE GRADIENTS

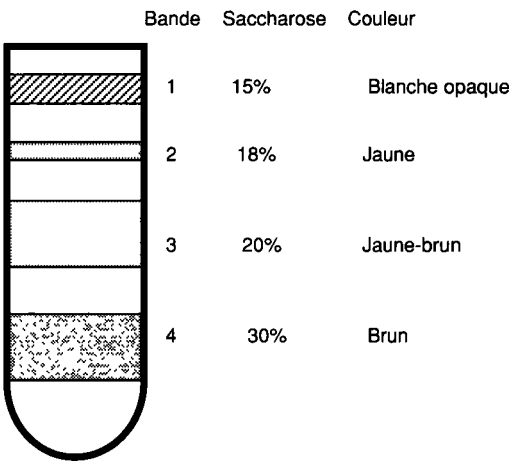
Il existe sur le marché plusieurs appareils permettant de former automatiquement des gradients linéaires. Chacun de ces appareils ayant des particularités propres, nous vous conseillons de consulter les instructions de chaque compagnie.

6.3. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les principales protéines sériques ont les masses moléculaire et les coefficients de sédimentation (S_{20}) suivants:

Protéine	Masse moléculaire	Coefficient de sédimentation
Albumine	69 000 kD	4.6
IgG	160 000 kD	6.6 à 7.2
IgA	160 000 kD	7 à 15
Fibrinogène	341 000 kD	7.6
IgM	960 000 kD	19, 30-150

Il est donc possible de séparer ces molécules dans un gradient de densité approprié. Après une ultracentrifugation de 16 h à 35 000 rpm, nous obtenons la séparation suivante:



Bande 1: lipoprotéines et inhibiteurs non spécifiques

Bande 2: albumine, immunoglobulines de faible masse moléculaire et IgG

Bande 3: IgG, IgA et fibrinogène

Bande 4: IgM et alpha-2 macroglobulines

Nous pouvons donc affirmer qu'à plus de 30% de saccharose, nous trouvons des IgM et qu'entre 20 et 30%, nous retrouvons des IgG.

Dans le cas d'une primoinfection récente, ce sont les IgM qui agissent comme anticorps sériques protecteurs car elles sont produites plus rapidement. Elles sont donc d'excellents indicateurs d'une infection récente sur un seul sérum.

7. RÉFÉRENCE

Lennette, E.H. et Schmidt, N.J. 1979. *Diagnostic procedures for viral and rickettsial and chlamydial infections*. American Public Health Association, Washington, DC.

13

IMMUNOFLUORESCENCE

Jacqueline Lecomte

1. INTRODUCTION

Les réactions antigène-anticorps, peuvent être visualisées ou quantifiées par une variété de méthodes et de marqueurs. Les marqueurs les plus utilisés sont les fluorochromes, les enzymes, les molécules denses aux électrons (ferritine et or colloïdal), les marqueurs radioactifs et, plus récemment, les marqueurs bioluminescents et chimioluminescents. Dans ce chapitre, nous allons décrire les méthodes couramment utilisées pour les marquages aux fluorochromes.

Les antigènes viraux, bactériens ou cellulaires peuvent être visualisés au niveau de la cellule à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes. Les techniques d'utilisation d'anticorps conjugués ont de nombreuses applications tant au niveau de la recherche que du diagnostic et seront décrites dans ce chapitre.

Les sérums utilisés pour l'immunofluorescence ne devraient pas être hémolysés, car une inactivation des immunoglobulines pourraient être occasionnée par une activité enzymatique d'un sérum hémolysé. La contamination bactérienne ou fongique devrait aussi être aussi évitée.

Pour la méthode de fluorescence directe, les anticorps doivent être spécifiques pour l'antigène étudié. Ces anticorps s'obtiennent par la purification des immunoglobulines, soit IgG ou IgM, à partir d'un antisérum animal. Les immunoglobulines purifiées sont généralement conjuguées avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou l'isothiocyanate de rhodamine (TRITC), les deux fluorochromes les plus utilisés. On obtient une coloration brillante vert pomme avec le FITC et rouge avec le TRITC. Les techniques de conjugaisons sont très bien décrites par Weir (1973).

Pour la méthode indirecte, les anticorps utilisés sont des anticorps dirigés contre les immunoglobulines d'une espèce animale ou contre des immunoglobulines humaines. Ces anticorps peuvent être spécifiques contre la chaîne lourde ou légère, contre le fragment Fc ou le fragment Fab. Ils sont conjugués au FITC ou au TRICT et peuvent être obtenus commercialement.

Il existe deux types de réactions: directe et indirecte. Pour la méthode directe, c'est un anticorps spécifique à un antigène donné qui est marqué à l'aide d'un fluorochrome. Cet antigène peut être un frottis de tissus infectés, une coupe de tissus ou un feuillet cellulaire infecté.

Dans la méthode indirecte, l'anticorps (provenant de l'espèce animale A) non conjugué se fixe sur l'antigène spécifique. Le complexe antigène–anticorps ainsi formé est détecté à l'aide d'un second anticorps (espèce animale B) conjugué cette fois à un fluorochrome et spécifique aux immunoglobulines de l'espèce animale A. Ainsi, pour démontrer la présence d'une infection à herpèsvirus, il faudra d'abord faire réagir un antisérum préparé chez une première espèce animale, par exemple chez le lapin. Le complexe virus-anticorps sera détecté à l'aide d'anti-immunoglobulines de lapin préparées chez une autre espèce animale et conjuguées à un fluorochrome. La méthode indirecte peut-être utilisée, non seulement pour la détection ou la visualisation d'un antigène, mais aussi pour la quantification d'un antisérum.

Avantages

Méthode directe

- rapide
- simple
- non spécificité faible
- requiert peu de témoins

Méthode indirecte

- plus sensible
- requiert un seul conjugué
- détection d'antigène ou d'anticorps

Désavantages

Méthode directe

- moins sensible
- antisérum de haute qualité requis
- non spécificité plus importante
- conjugué spécifique requis pour chaque antigène
- non quantitative

Méthode indirecte

- plus de témoins.
- moins rapide.

2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL

Les antigènes viraux peuvent être décelés à partir de sections de tissus, biopsies, de feuillets cellulaires infectés ou à partir de frottis obtenus d'écouvillons rhinopharyngiens, rectaux, etc.

2.1. PRÉPARATION ET INFECTION DE CELLULES POUR VIRUS À CROISSANCE RAPIDE

Des feuillets cellulaires peuvent être infectés avec un isolat clinique pour des fins de diagnostic ou avec un virus spécifique pour des fins de recherche. Pour un virus à croissance rapide, c'est-à-dire pouvant exprimer un début d'effet cytopathique en 24 h, les cellules sensibles à un virus peuvent être infectées directement sur des lames de microscope recouvertes d'une couche mince de "Teflon", laquelle est séparée en 8, 12, 16, ou 32 puits. Ces lames sont disponibles commercialement chez Flow Laboratories Inc. ou chez Cel-Line Associates, Inc. (Newfield, N.J.). Ces lames sont résistantes à l'acétone, hydrophobes et autoclavables.

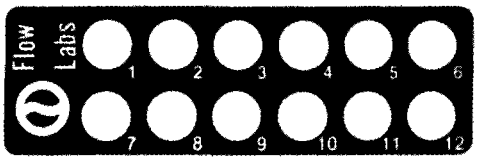


Figure 1

Lames à puits multiples pour immunofluorescence sur cellules.

Méthode

1. Diluer des cellules sensibles au virus étudié à raison de 500 000 cellules/mL de milieu de croissance contenant 25 mM de tampon HEPES (hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid).

2. Déposer sur chacun des puits 25 µL de cellules (puits de 8 mm) ou 20 µL (puits de 6 mm).

N.B. Les lames doivent être stériles.

3. Infecter les cellules avec le virus étudié à la dilution pouvant infecter 70% à 80% des cellules en 24 h.

4. Incuber 24 h à 37°C dans une étuve à CO_2 humidifiée. Afin d'éviter l'assèchement des puits, déposer les lames dans une boite de Petri stérile.

2.2. PRÉPARATION ET INFECTION DE CELLULES POUR UN VIRUS À CROISSANCE LENTE

Pour un virus à croissance lente alors que l'effet cytopathique se développe en plus de 24 h, plusieurs approches peuvent être utilisées: soit une infection réalisée *in situ*, dans des tubes de Leighton ou sur des lames Lab-Tek (Miles Laboratories), soit une infection réalisée sur un feuillet cellulaire pré-formé en flacon de 25 cm^2. Dans ce dernier cas, lorsque l'effet cytopathique commence à se manifester, il faut récupérer les cellules infectées par trypsination ou par grattage des cellules avec un policeman en caoutchouc. On procède par la suite comme ci-haut, sauf que l'incubation se poursuivra pendant trois heures seulement, soit un temps suffisant pour l'adhérence des cellules.

2.3. PRÉPARATION DE TISSUS

La détection d'antigènes viraux dans les tissus d'animaux infectés ou dans les biopsies requiert généralement la préparation de coupes histologiques. Les techniques les plus couramment utilisées sont la préparation de coupes minces par cryotomie ou à la suite d'un enrobage à la paraffine. Il y a parfois dénaturation de l'antigène par cette dernière méthode.

2.3.1. Cryotomie

1. Prélever le ou les organes et couper des morceaux de 5 mm^3.

2. Placer ceux-ci dans de l'azote liquide, ou si non disponible, congeler à –70°C ou plonger dans un bain de glace sèche et de méthanol. Les tissus congelés peuvent être gardés à –70°C jusqu'à leur utilisation ultérieure. Les tissus conservés à –20°C peuvent perdre rapidement leur antigénicité.

3. Faire des coupes de 4–6 µm à l'aide d'un microtome dans un cryostat.

4. Déposer les coupes sur des lames de microscope et laisser sécher à l'air ambiant pendant 10–30 min ou par ventilation à l'aide d'un séchoir à cheveux.

Ces lames peuvent être gardées à –70°C dans un contenant hermétique auquel on aura ajouté un agent séchant tel le gel de silice.

2.3.2. Enrobage à la paraffine

1. Couper le tissu en morceaux de moins de 5 mm^3.

2. Placer dans une solution d'éthanol 95% à 4°C pendant 16-24 h.

3. Placer dans une solution d'éthanol 100% à 4°C (trois périodes de 2 h avec agitation).

4. Placer dans trois bains de xylène de 2 h chacun à 4°C.

5. Placer le dernier bain de xylène contenant le tissu à la température de la pièce.

   Si l'enrobage à la paraffine ne suit pas immédiatement, il est possible de conserver le tissu dans le xylène à 4°C pendant 1–2 jours.

6. Enrober à la paraffine à 56°C par passage dans quatre bains successifs d'une heure chacun.

7. Placer les blocs à la température de la pièce puis à 4°C dès la solidification. Ces blocs se conservent plusieurs semaines.

8. Faire des coupes de 1 à 5 µm.

9. Déparaffiner par deux bains de xylène à 4°C de 30 sec chacun.

10. Rincer trois fois à l'éthanol 95% à 4°C.

11. Laver trois fois 1 min au PBS à 4°C.

12. Effectuer la réaction d'immunofluorescence ou conserver à –70°C.

2.4. FIXATION DES CELLULES OU TISSUS

À la suite de l'adhérence des cellules ou tissus, les cellules ou substrats antigéniques sont fixés à l'acétone froid pendant 10 à 60 min. L'acétone froid est généralement le meilleur fixatif et le plus couramment utilisé. La fixation peut aussi se réaliser avec du paraformaldéhyde. Une solution de 4% de paraformaldéhyde sera préparée avec 0.1 M de sodium de phosphate à 60°C, pH 7.2 et les cellules ou tissus seront fixés pendant 5 min à la température de la pièce.

3. MÉTHODE

3.1. IMMUNOFLUORESCENCE DIRECTE

Cette méthode est très appropriée pour détecter les antigènes viraux dans les tissus ou les cellules infectées. Cette méthode est rapide mais nécessite un anticorps spécifique conjugué.

1. Appliquer l'anticorps spécifique conjugué pendant 30 min.

2. Laver au moins trois fois dans du PBS avec agitation pendant 15 min.

3. Monter sous lamelle avec de la glycérine:PBS (1:9).

Les témoins

- Les cellules ou tissus infectés en réaction avec un anticorps conjugué de même espèce animale mais non dirigé contre l'antigène à l'étude.

- Les cellules ou tissus de même origine et non infectés en réaction avec l'anticorps conjugué spécifique.

3.2. IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

Cette méthode est aussi appropriée pour la détection d'un antigène viral et elle est plus sensible que la méthode directe. De

plus, elle permet de titrer un antisérum. Le conjugué sera généralement utilisé à la dernière dilution donnant une fluorescence facilement repérable lorsque mis en réaction avec un antisérum dilué à 1/4 tout en donnant une fluorescence non spécifique négligeable.

1. Faire réagir l'antisérum pendant 30 min.

2. Laver au PBS au moins trois fois pendant 15 min.

3. Révéler la réaction avec un conjugué anti-immunoglobuline préalablement titré pendant 30 min.

4. Laver au PBS.

5. Monter.

Les témoins:

- Les cellules ou les tissus infectés en réaction avec un sérum de même espèce animal que l'antisérum à l'étude mais ne contenant pas d'anticorps spécifiques.

- Les cellules ou les tissus de même origine, mais non infectés en réaction avec l'antisérum à l'étude et le conjugué.

3.3. ÉLIMINATION DE LA FLUORESCENCE NON SPÉCIFIQUE

La fluorescence non spécifique peut être considérablement réduite en utilisant du bleu d'Evans comme contre- colorant. La solution est préparée à 0.003% dans de l'eau distillée et filtrée. Cette solution est appliquée sur les cellules ou tissus fixés pendant 15–30 min juste avant le montage au glycérol tamponné. La fluorescence non spécifique peut aussi être diminuée en utilisant des antisérums centrifugés et dilués dans 1% d'albumine bovine ou de l'ovalbumine. Ces derniers ne pourraient pas être utilisés pour le titrage d'un antisérum bovin ou aviaire respectivement. Il est aussi possible d'obtenir commercialement des conjugués pré-adsorbés ou préparés à partir d'anticorps monoclonaux de haute spécificité.

4. MICROSCOPIE

L'observation se fait à l'aide d'un microscope équipé d'une lampe à vapeur de mercure. Cette lampe émet des rayons de différentes longueurs d'ondes. Chaque fluorochrome ayant une longueur d'onde particulière d'excitation et d'émission, il est possible de sélectionner ces longueurs d'ondes à l'aide de filtres.

Le FITC est excité par le bleu à 490 nm et émet une lumière verte à 520 nm. Le TRITC est excité par le vert à 540 nm et émet une lumière rouge à 625 nm. Outre le choix de la source de lumière appropriée, celui de la combinaison des filtres est très important. La clarté et le contraste de l'image fluorescente dépendent de la largeur de la bande passante d'une combinaison de filtres. Si la transmission est à bande large, l'image fluorescente sera plus claire mais moins contrastante et moins spécifique. Si la transmission est par bande étroite, l'image fluorescente sera légèrement plus foncée, mais par contre, plus contrastante et plus spécifique. Pour s'assurer d'une combinaison de filtres appropriée, on consulte généralement le distributeur.

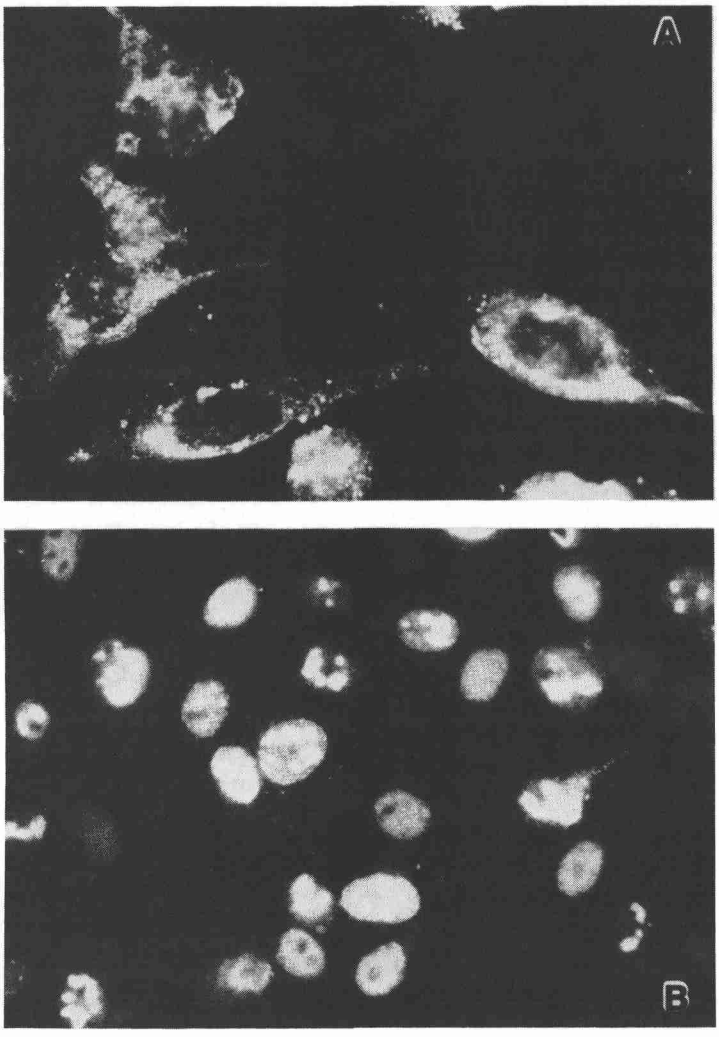


Figure 2

Méthode d'immunofluorescence indirecte

Cellules Vero infectées par le virus herpès type 1 ou 2 pendant 18 h et mises en réaction avec un anticorps monoclonal murin spécifique au type 1 ou 2. Les anticorps fixés ont été détectés avec des IgG de chèvre anti-IgG de souris conjuguées à la fluorescéine. Une fluorescence cytoplasmique forte est observée avec les anticorps dirigés contre le type 1 (figure 2a) alors que les anticorps dirigés contre le type 2 détectent un antigène nucléaire (figure 2b).

5. RÉFÉRENCES

Hijmans. M et Schaeffer, M.. 1975. *Fifth International Conference on Immunofluorescence and related techniques*. Annals of the New York Academy of Sciences 254: 1-420.

Kurstak, E. et Kurstak, C. 1974. Application of the immunoperoxidase technique in virology and cancer virology. dans *Viral immunodiagnostic*. E.Kurstak et R.Morrisset. (Édit.) Academic Press, New York, pages 1-34.

14

IMMUNOPEROXYDASE

Serge Belloncik

Les techniques immunochimiques et immunoenzymatiques sont couramment utilisées à des fins de diagnostic et de recherche. Elles permettent de localiser des antigènes de nature et d'origine variées, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques et d'un marqueur lié à ces derniers. De plus, ces techniques permettent de dépister la présence d'anticorps spécifiques dans un sérum donné.

Le principe de base de toutes ces techniques est le même. Il s'agit de coupler l'anticorps à un marqueur qui est visualisé en microscopie photonique et/ou électronique. Il s'agit alors d'immunofluorescence, d'immunoferritine ou d'immunoperoxydase, selon que le marqueur est l'isothiocyanate de fluorescéine, la ferritine ou la peroxydase. Dans le cas de l'immunoperoxydase, l'anticorps est couplé d'une façon covalente à la peroxydase. La révélation de l'activité enzymatique de cette dernière par la 3–3' diamino-benzidine (DAB) en présence de peroxyde d'hydrogène se traduit par un précipité brun observable en microscopie photonique ou dense aux électrons après traitement au tétroxyde d'osmium. Ce précipité localise la peroxydase sur l'anticorps et par conséquent l'antigène spécifique. La technique d'immunoperoxydase a été utilisée couramment depuis plus de vingt ans (Nakane et Pierce 1966, Wicker et Avrameas 1966), notamment en virologie (Kurstak 1971, Kurstak *et al.* 1974 et 1977, Tijssen 1985).

Tout comme l'immunofluorescence, les techniques directe et indirecte peuvent être pratiquées. Cependant deux autres techniques utilisant des complexes solubles peroxydase-antiperoxydase (PAP) (Sternberger *et al.* 1970) ou des complexes avidine-biotine (Hsu *et al.* 1981a, 1981b) peuvent contribuer à améliorer le rendement de la technique en terme de sensibilité et de spécificité.

Avantages de l'immunoperoxydase par rapport à l'immunofluorescence

- sensibilité et spécificité de la technique accrues considérablement
- application en microscopie photonique et électronique: la peroxydase, dont la masse moléculaire est inférieure à celle de la ferritine, ou d'autres enzymes telle que la phosphatase alcaline, permettent de localiser plus aisément les antigènes intracytoplasmiques

- ne nécessite pas d'appareillage sophistiqué
- la coloration peut être permanente
- la conjugaison des anticorps à l'enzyme est stable

Désavantages de l'immunoperoxydase par rapport à l'immunofluorescence

- addition d'une étape supplémentaire de révélation enzymatique
- utilisation de produits pouvant être cancérigènes (DAB)
- préparation du conjugué plus compliquée que l'immunofluorescence
- coût plus élevé

Les techniques de production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux ainsi que la conjugaison des anticorps à l'enzyme peroxydase peuvent contribuer largement à une meilleure spécificité et sensibilité de l'immunoperoxydase. Ces techniques ne seront pas traitées dans ce chapitre. Elles sont décrites en détail dans l'ouvrage de Tijssen (1985).

1. APPLICATION À LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

1.1. FIXATION

Plusieurs procédés de fixation peuvent être utilisés et doivent être adaptés à l'antigène recherché ou aux cellules. Le but étant de détecter un antigène dans une cellule, il est impérieux de choisir un fixateur qui préserve les structures cellulaires et l'antigénicité ainsi que de traiter les cellules par un agent perméabilisant si nécessaire. Par exemple, dans le cas d'un antigène liposoluble, il faut éviter d'utiliser des solvants de lipides. Nous donnons ci-après la technique standard de fixation qui devra être adaptée et modifiée selon les besoins de chaque expérimentation. Le lecteur pourra avoir plus de détails en se référant à d'autres ouvrages de référence.

1.1.1 Frottis et feuillet cellulaires

Les cellules sont fixées pendant 15 min au méthanol 100%, à l'acétone 100% ou à un mélange acétone:méthanol (1:1) (4°C ou à –20°C), puis lavées avec de la saline. Dans certains cas, on obtient de meilleurs résultats avec le paraformaldéhyde pendant 1 h à 4°C.

Préparation de la solution de paraformaldéhyde

1. Dissoudre 10 g de paraformaldéhyde dans 50 mL d'eau distillée à 60°C sous agitation constante.
2. Ajouter 2–6 gouttes de NaOH 100 mM pour éclaircir la solution et compléter à 500 µL par addition de phosphate de sodium 110 mM pH 5.5 et 1 g de NaCl.

1.1.2. Cultures de cellules en cabarets

Le milieu de culture est rejeté et les cellules traitées tel que décrit précédemment en ayant soin de les recouvrir complètement avec le fixateur et les solutions utilisées lors de la réaction.

1.1.3 Coupes de tissus

Dans le cas de pièces d'organes, les coupes de tissus enrobés dans la paraffine ou effectuées à congélation sont fixées sur lame selon les techniques conventionnelles d'histologie.

1.2. IMMUNOPEROXYDASE DIRECTE

Cette technique permet de retracer dans une cellule un antigène donné dont le laboratoire possède l'antisérum correspondant. Elle n'est pas applicable à la recherche d'un anticorps dans un sérum. Cette technique requiert la purification et le couplage au laboratoire des immunoglobulines à la peroxydase de Raifort.

1. Traiter les cellules avec une solution de H_2O_2 0.3% pendant 30 min, pour éliminer la peroxydase endogène, si elle est présente.

2. Recouvrir les cellules ou tissus de la suspension d'immunoglobulines marquées purifiées (20–100 mg/mL) à la dilution optimale prédéterminée pendant 2 h à 37°C en chambre humide.

3. Laver avec le tampon phosphate 3 fois 5 min.

4. Recouvrir les cellules avec la solution de révélation. Le temps de révélation varie de 5 à 20 min. La vitesse de la révélation peut être contrôlée au microscope photonique.

Solution de DAB

3-3'-diamino-benzidine tetrahydrochlorure ..... 50 mg

Tampon Tris-HCl pH 7.6
50 mM ..... 100 mL

Filtrer sur papier Whatman avant utilisation et ajouter 0.01% de H_2O_2.

NOTE: Le DAB est une substance potentiellement cancérigène. Manipuler avec des gants et un masque chirurgical.

5. Lorsque la réaction est jugée optimale (maximum de précipité, minimum de coloration de fond), les lames sont lavées pendant 5 min avec du tampon Tris–HCl. Une courte coloration de fond avec un quelconque colorant est optionnelle. Les opérations subséquentes reliées au montage des lames se font suivant les techniques classiques d'histologie.

1.3. IMMUNOPEROXYDASE INDIRECTE

Cette technique comparée à la précédente, est plus longue d'exécution. Cependant, elle a l'avantage de permettre l'utilisation d'un seul type d'immunoglobuline conjuguée à la peroxydase (achetée généralement dans le commerce) pour un grand nombre d'antigènes divers, à condition que les différents anticorps spécifiques aux antigènes soient de la même espèce animale. De plus, les anticorps non marqués n'ont pas besoin d'être purifiés.

1. Fixer telle que décrit précédemment (voir section 1.1).

2. Recouvrir les cellules avec des anticorps spécifiques mais non marqués (1–25 mg/mL) pendant 2 h à 37°C en chambre humide.

3. Effectuer les lavages.

4. Recouvrir les cellules avec un antisérum anti-IgG marqué à la peroxydase pendant 2 h à 37°C en chambre humide.

5. Laver, révéler de l'activité enzymatique et monter, tels que décrits précédemment (Figure 1).

2. PEROXYDASE ANTI-PEROXYDASE (PAP)

Dans ce cas, la peroxydase n'est pas couplée chimiquement à l'anticorps: il s'agit plutôt d'une association à l'anticorps par une union du type complexe antigène-anticorps soluble. Cette technique est plus sensible que les deux précédentes. Le complexe PAP peut être acheté dans le commerce ou préparé au laboratoire (Tijssen 1985).

1. Fixer tel que décrit précédemment.
2. Recouvrir les cellules avec l'anticorps (dilution 1/100 à 1/1000 dans le tampon isotonique) pendant 1 h à la température de la pièce.
3. Effectuer les lavages.
4. Recouvrir avec l'anti-IgG à une dilution optimale prédéterminée, pendant 1 h à la température de la pièce.
5. **Effectuer les lavages.**
6. Recouvrir les cellules avec la solution appropriée (anti-IgG utilisé à l'étape 4) de PAP (40 µg/mL) (dilution faite dans du tampon contenant 1% de sérum normal) pendant 1 h à la température de la pièce.
7. Laver, révéler de l'activité enzymatique et monter, tels que décrits précédemment.

3. COMPLEXE AVIDINE-BIOTINE (ABC)

L'avidine est une glycoprotéine ayant une très grande affinité pour la biotine. Elle possède quatre sites d'attachement pour la biotine et peut être conjuguée à des enzymes dont la peroxydase. Cette nouvelle technique d'immunoperoxydase (Hsu *et al.* 1981a, b) a recourt à un premier anticorps, puis à un deuxième biotynilé, et finalement à la réaction avec un complexe avidine-peroxydase biotinilé. Cette technique s'est révélée plus sensible que les autres et elle réduit la coloration de fond. Des trousses commerciales (ABC Kit Vecta Stain® Vector Laboratories) sont disponibles dans le commerce pour ce type de détection.

1. Fixer les cellules.
2. Recouvrir pendant 20 min avec du sérum normal de la même espèce animale que le deuxième anticorps.
3. Éponger l'excès de sérum.
4. Recouvrir avec l'anticorps spécifique dilué, pendant 1 h à la température de la pièce en chambre humide.
5. Laver 10 min dans le tampon.
6. Recouvrir avec le complexe anti-IgG biotinilé dilué (selon les recommendations du fabricant) pendant 1 h à la température de la pièce en chambre humide.
7. Effectuer les lavages.
8. Recouvrir pendant 1 h avec le complexe avidine-biotine (8 µg/mL d'avidine, 2 µg/mL de biotine-peroxydase).
9. Laver, révéler de l'activité enzymatique et monter, tels que décrits précédemment.

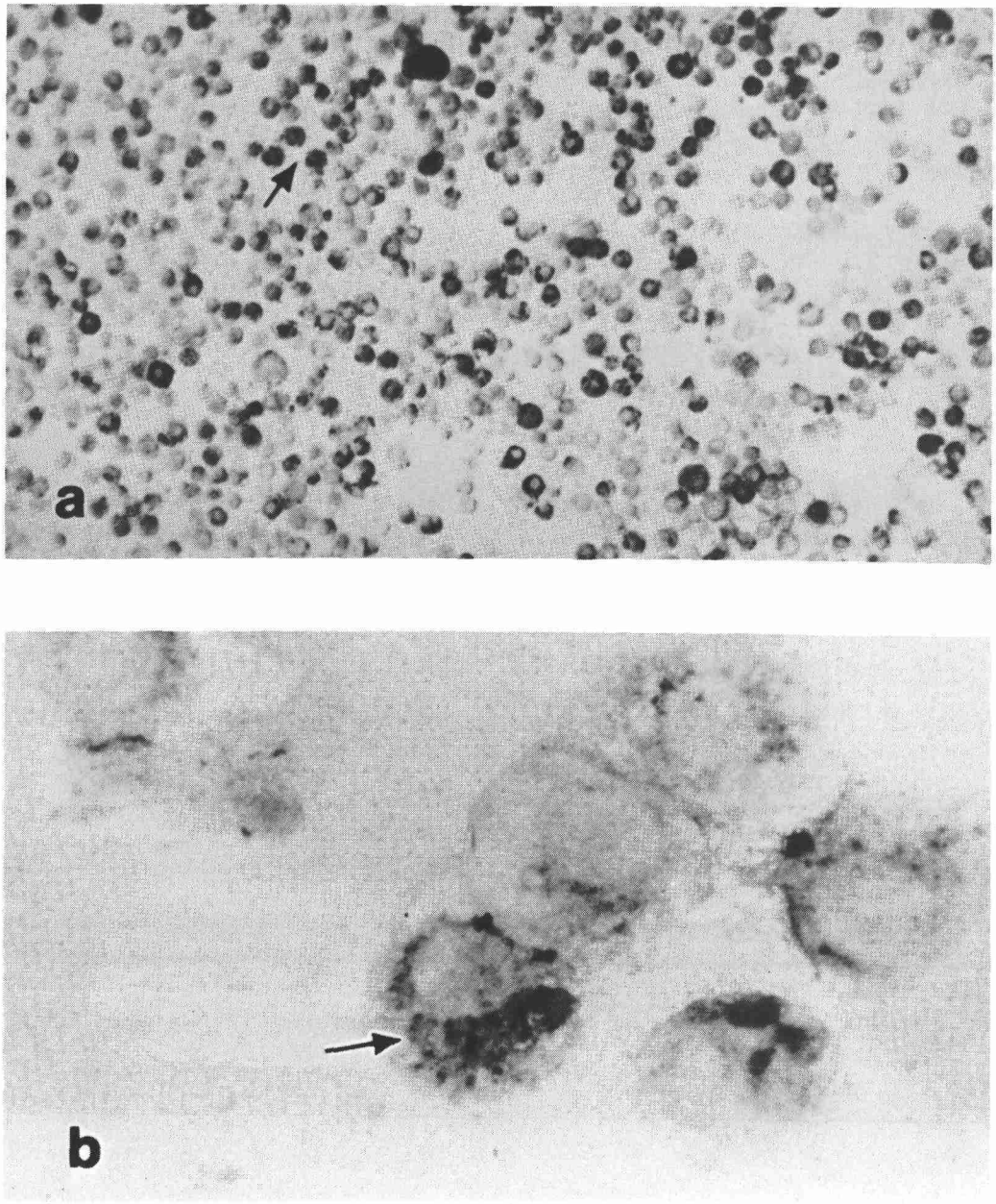


Figure 1

Détection d'antigènes viraux dans une culture cellulaire par l'immunoperoxydase indirecte

Les cellules dont le cytoplasme est de teinte sombre (flèche) sont des cellules infectées par le virus de la polyédrose cytoplasmique depuis 18 h (Reoviridae) (grossissement: a- 150X; b- 1000X).

4. RÉFÉRENCES

Kurstak, E. 1971. The immunoperoxidase technique: localization of viral antigens in cells. Methods in virology 5: 4233-444.

Kurstak, E. et Kurstak, C. 1974. Application of the immunoperoxidase technique in virology and cancer virology. dans *Viral immunodiagnostic* E. Kurstak et R. Morrisset (Édit.). Academic Press, New York, pages 3-30.

Kurstak, E., Tijssen, P. et Kurstak, C. 1977. Immunoperoxidase technique in diagnostic virology and research: principles and applications. Dans *Comparative diagnosis of viral disease. Human and related virus part B.* E. Kurstak and C. Kurstak (Édit.) Academic Press, New York. pages 403-448.

Nakane, P.K. et Pierce, G.B. 1966. Enzyme-labelled antibodies: preparation and application for the localization of antigens. J. Histochem Cytochem. 14: 929-935.

Stenberger, L.A., Hardy, P.H. Jr, Cuarlis, J.J. and Meyer, H.G. 1970. The unlabelled antibody enzyme method of immunocytochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody coupled horseradish peroxidase-anti-horseradish peroxidase and its use in identification of spirochetes. J. Histochem Cytochem. 18: 315.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay. Dans *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Volume 15, 548 pages.

Wicker, R. and Avrameas, S. 1969. Localization of virus antigens by enzyme-labelled antibodies. J. Gen. Virol. 4: 465-471.

15

ELISA

Pierre J. Talbot

1. INTRODUCTION

Les interactions spécifiques entre antigènes et anticorps constituent un pilier de l'immunovirologie moderne. Une variété de techniques ont été développées pour observer et mesurer ces interactions. Les techniques les plus sensibles font appel à la détection de l'interaction spécifique antigène-anticorps à l'aide d'indicateurs quantifiables. Ainsi, le radioimmunodosage a fait son apparition au cours des années 50. Le test fait appel au marquage radioactif de réactifs se liant spécifiquement aux complexes antigènes-anticorps. Ce type de test est encore utilisé aujourd'hui, cependant sa popularité tend à diminuer à cause des dangers de la radiation, de la demi-vie assez courte des isotopes utilisés et de la nécessité d'avoir accès à des compteurs de radioactivité. En 1971, deux groupes de chercheurs (Engvall et Perlmann 1971, Van Weemen et Schuurs 1971) eurent l'idée de remplacer l'isotope radioactif par un enzyme. Cette technique permet l'utilisation de substrats chromogènes et une visualisation de la présence de complexes antigènes-anticorps par l'apparition de produits colorés pouvant être quantifiés au spectrophotomètre. La technique fut nommée ELISA pour "Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay" (Engvall et Perlmann 1971), ou EIA pour "Enzyme Immuno Assay" (Van Weemen et Schuurs 1971).

Le test ELISA tel qu'utilisé lors de son introduction faisait appel à une phase solide composée de cellulose. Plus récemment, l'utilisation du test ELISA, à la fois en recherche et en clinique, connaît un essor important grâce aux microcabarets comportant 96 puits dans un format standard de 12 x 8 puits, et à l'utilisation des lecteurs de densité optique à faisceaux verticaux qui permettent de lire en quelques secondes l'absorbance des 96 puits.

Le lecteur désireux de se familiariser avec tous les aspects théoriques et pratiques des tests immunoenzymatiques devrait consulter l'ouvrage de Tijssen (1985). Le but du présent chapitre est essentiellement de décrire la méthodologie la plus couramment utilisée par les virologistes. Il s'agit du test ELISA non-compétitif en phase solide pour la détection des anticorps ou des antigènes. Un test ELISA

compétitif est décrit dans le chapitre suivant.

2. MESURE DES ANTICORPS

2.1. PRÉPARATION DES ANTIGÈNES VIRAUX

L'antigène viral peut consister en un virus purifié (voir chapitre sur la purification de virus par ultracentrifugation). Toutefois, un tel antigène peut être relativement onéreux et/ou difficile à produire: de plus, il peut arriver que les protéines cellulaires sont copurifiées avec le virus. Une telle possibilité doit donc être contrôlée en utilisant un antigène témoin dans le test ELISA. Le choix du témoin approprié pour permettre l'élimination des réactions faussement positives lors de la détection des anticorps devient alors un problème épineux. En effet, l'utilisation de cellules non infectées pour la "purification" de l'antigène témoin n'est souvent pas appropriée, les contaminants cellulaires retrouvés dans la préparation d'antigène viral, soi-disant purifiée, sont souvent adsorbés sur les virions et ne se retrouvent donc pas à la même position dans un gradient utilisant seulement du matériel provenant de cellules non infectées. Dans ce cas, le témoin le plus approprié demeure un virus non apparenté antigéniquement, mais produit sur les mêmes cellules. Il est donc beaucoup plus pratique d'utiliser comme antigène viral une préparation obtenue à partir d'un lysat de cellules infectées, ce qui permet alors l'utilisation de l'antigène témoin idéal: un lysat de cellules non infectées. Le protocole décrit ici utilise des feuillets cellulaires, mais on peut se servir de cellules en suspension.

Méthode

1. Infecter les cellules avec le virus.
2. Lorsque la présence d'antigènes viraux est maximale (titre infectieux, effet cytopathique, détection immunologique, etc.), laver les cellules deux fois et les suspendre à l'aide d'un policeman dans du tampon PBS pH 7.4 (1-3 mL par flacon de 150 cm^2). Il est possible, à ce stade, de les garder congelées à –20°C.
3. Briser les cellules par cinq cycles de congélation-décongélation (glace sèche, éthanol ou congélateur –70°C/ bain-marie ou étuve 37°C).
4. Traiter le lysat cellulaire aux ultrasons sur glace (deux fois 1 min) en laissant reposer 1 min entre les deux traitements.
5. Éliminer les débris par une centrifugation à 1000 x *g* pendant 10 min et conserver le surnageant.
6. Centrifuger ce surnageant à 100 000 x *g* pendant 60 min pour sédimenter les virus.
7. Suspendre le culot dans un petit volume de PBS pH 7.4 (0.3–0.4 mL par flacon de 150 cm^2).
8. Reprendre le traitement aux ultrasons comme à l'étape 4.
9. Répartir en petits volumes et conserver à –20 ou –70°C. Un entreposage temporaire à 4°C est possible si l'on ajoute un agent bactéricide (merthiolate de sodium 1 mM).

2.2. MÉTHODE INDIRECTE

Certains auteurs ont utilisé le tampon carbonate-bicarbonate pH 9.6 ou encore un tampon glycine pour favoriser l'adsorption de l'antigène. Dans plusieurs cas le PBS est adéquat et même préférable, mais il est toujours important d'évaluer

quelques solutions tampons pour déterminer laquelle est la plus appropriée.

Le type de cabarets utilisés peut aussi influencer fortement l'adsorption de l'antigène à la phase solide. Certains fabricants proposent des plateaux dont le plastique a été traité pour favoriser cette adsorption. On peut utiliser le polystyrène et le polymère de vinyle, mais il faudra expérimenter davantage pour trouver le substrat optimal.

1. Bien mélanger la préparation d'antigène et incuber si possible dans un bain à ultrasons pendant 1 min.

2. Diluer dans du tampon PBS. La concentration d'antigène à utiliser a été préalablement déterminée à l'aide d'un sérum positif de référence. On se sert de la quantité minimale d'antigène permettant l'obtention d'une réaction spécifique maximale. Une fois la dilution d'antigène effectuée, une incubation de 1 min dans un bain à ultrasons est souhaitable mais non essentielle.

3. Ajouter de la préparation d'antigène dilué à raison de 100 µL par puits.

4. Incuber une nuit à 25°C ou au moins 2 h à 37°C.

5. Vidanger la solution d'antigène par inversion des microcabarets et ajouter 150 µL par puits d'une solution de blocage des sites de réactions non spécifiques (PBS pH 7.4 avec 10% sérum de fœtus de veau et 0.2% de Tween 20). Le Tween 20 peut être remplacé par 0.5% de Nonidet P–40 ou 0.1% de désoxycholate de sodium. Incuber pendant 60 min à 25°C.

6. Vidanger la solution de blocage et placer 100 µL par puits de dilutions par 2 ou 5 d'antisérum (effectuées directement dans le microcabaret, à l'aide d'une pipette à 8 ou 12 canaux). Incuber pendant 90 à 120 min à 25°C.

7. Vidanger les puits et laver trois fois avec du tampon de lavage (PBS pH 7.4 avec 0.05–0.1% de Tween–20). On peut utiliser un appareil automatique ou semi-automatique, mais on peut effectuer des lavages manuels lorsqu'un petit nombre d'échantillons sont testés.

8. Ajouter 100 µL par puits d'une solution préalablement préparée dans du tampon de blocage d'antisérum conjugué à la peroxydase de raifort (dilution 1:500 à 1:2000 ou déterminée par l'expérimentation) et spécifique pour le type d'immunoglobuline utilisé comme premier anticorps. Dans certains cas la protéine A conjuguée à la peroxydase peut remplacer l'antisérum conjugué. Incuber pendant 90 à 120 min à 25°C.

9. Bien laver les plateaux puis ajouter 100 µL par puits d'une solution fraîche de substrat et incuber 30 min à 25°C dans l'obscurité.

Tampon citrate pH 5.0

Acide citrique anhydre
0.05 M ..... 10 g

Phosphate de sodium
dibasique anhydre 0.1 M ..... 14 g

Dissoudre dans 900 mL d'eau distillée.

Ajuster à pH 5 et compléter à 1 L.

Solution de substrat

Tampon citrate pH 5.0 ..... 20 mL

Ortho-phénylènediamine (OPD) ..... 8 mg

Peroxyde d'hydrogène 30% ..... 6.6 µL

10. Pour arrêter la réaction, ajouter 100 µL par puits de HCl 1 N. Lire l'absorbance à 492 nm au spectrophotomètre ou avec un lecteur de plateaux (Titertek Multiskan ou l'équivalent) ou encore faire une lecture visuelle en comparant les résultats aux contrôles.

2.3. MÉTHODE INDIRECTE EN SANDWICH

Dans les cas où l'antigène viral s'adsorbe mal au plastique ou est moins bien reconnu par les anticorps après adsorption, il y a lieu d'ajouter une étape supplémentaire au test décrit ci-haut. Il s'agit d'adsorber préalablement au plastique un antisérum spécifique à l'antigène viral (en général une nuit à 25°C). La dilution optimale d'antisérum doit alors être déterminée préalablement par un test en échiquier dans lequel les dilutions d'antisérum et d'antigène sont variées simultanément sur le même microcabaret (e.g. 8 dilutions d'antisérum et 12 dilutions d'antigène). L'antigène est alors détecté par un second antisérum spécifique de référence. Cette modification du test ELISA peut aussi être utilisée pour quantifier la présence d'antigènes viraux dans un échantillon.

2.4. EXPRESSION DES TITRES ELISA

La concentration d'antigène est déterminée par comparaison avec une courbe standard établie avec différentes concentrations d'un antigène de référence. Par contre, l'expression du titre en anticorps spécifiques donne lieu à plus d'ambiguïtés.

L'antisérum à tester est dilué en série tel que décrit précédemment et le titre est généralement établi comme étant la dilution maximale à laquelle la réaction enzymatique peut encore être détectée. Ce titre peut être établi visuellement d'une manière semi-quantitative. Toutefois, la lecture de l'absorbance permet une détermination plus quantitative. Pour ce faire, un antisérum négatif est inclus dans le test et dilué en série avant la réaction avec l'antigène viral. L'absorbance (bruit de fond) ainsi obtenue permet d'obtenir une absorbance moyenne à laquelle deux écart-types sont ajoutés pour obtenir l'absorbance limite au-dessus de laquelle les réactions sont considérées comme spécifiques. Le titre est alors exprimé comme étant la dilution d'antisérum où la courbe de liaison de l'anticorps à l'antigène entrecoupe cette absorbance limite. La transformation des dilutions sous une forme logarithmique facilite l'estimation précise du titre. Il faut toutefois comprendre que ce titre ne tient aucunement compte de l'affinité des anticorps mesurés, la pente de la courbe de liaison étant en général directement proportionnelle à cette affinité (Peterfy *et al.* 1983).

Il est à noter qu'il est aussi possible de ne tester qu'une seule dilution d'antisérum si l'on cherche uniquement à déterminer la positivité, comme par exemple pour le criblage des anticorps monoclonaux. En général, un échantillon est considéré positif si l'absorbance observée après réaction avec l'antigène viral est plus de deux fois supérieure à celle observée après réaction avec l'antigène contrôle.

3. RÉFÉRENCES

Engvall, E. et Perlmann, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. Immuchem. 8: 871-874.

Péterfy, F., Kuusela, P. et Mäkela, O. 1983. Affinity requirements for antibody assays mapped by monoclonal antibodies. J. Immunol. 130: 1809-1813.

Talbot, P.J., Salmi, A.A., Knobler, R.L. et Buchmeier, M.J. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus-4 (strain JHM): correlation with biological activities. Virology 132: 250-260.

Tijssen, P. 1985. Practice and theory of enzyme immunoassay. Dans *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. Volume 15, 548 pages.

16

IDENTIFICATION DES SITES ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Pierre J. Talbot

1. INTRODUCTION

L'utilisation d'anticorps monoclonaux, facilite grandement l'identification sur des protéines virales de sites antigéniques importants dans l'interaction du virus avec l'hôte. Gerhard *et al.* (1978) furent les pionniers de cette nouvelle approche qu'ils ont appliquée au virus de la grippe. En effet, un anticorps monoclonal reconnaît spécifiquement un assemblage séquentiel ou conformationnel de quelques acides aminés seulement, que l'on appelle épitope. Cette spécificité est très grande puisque la modification d'un seul acide aminé à l'intérieur d'un tel épitope suffit à abolir la reconnaissance par l'anticorps monoclonal. Toutefois, la taille considérable d'une immunoglobuline nécessite l'introduction de la notion de site antigénique comme étant un regroupement de plusieurs épitopes localisés si près les uns des autres qu'ils ne peuvent pas être différentiés par les tests opérationnels décrits plus loin (Lubeck et Gerhard 1981, Yewdell et Gerhard 1981).

Deux approches méthodologiques complémentaires sont utilisées pour le délinéament des sites antigéniques sur les protéines virales: des tests de compétition entre anticorps monoclonaux pour la liaison sur la protéine virale et la sélection de variants antigéniques par pression sélective d'un anticorps monoclonal.

2. TEST DE COMPÉTITION

Cette technique met à profit le test de radio-immunodosage ou d'ELISA en phase solide. On doit d'abord obtenir une batterie d'anticorps monoclonaux spécifiques à une seule protéine virale en immunoprécipitation (voir Chapitre 20). Chaque anticorps est alors marqué soit radioactivement (^{125}I), soit avec un enzyme (peroxydase de raifort) ou encore avec la biotine. La série d'anticorps est alors analysée en paires, anticorps marqué/anticorps non marqué, avec la protéine virale absorbée sur une phase solide telle que les puits d'un microcabaret de plastique. Si l'anticorps

non-marqué reconnaît un épitope physiquement identique ou rapproché de celui reconnu par l'anticorps marqué, ce dernier verra sa liaison avec la protéine virale bloquée par l'encombrement stérique occasionné par l'anticorps non-marqué. D'autre part, aucune compétition ne sera observée si les deux épitopes sont suffisamment éloignés, c'est-à-dire contenus dans deux sites antigéniques différents. Par ailleurs, l'observation d'une compétition partielle entre ces deux anticorps indique que les épitopes sont suffisamment éloignés l'un de l'autre, mais qu'ils sont toujours à l'intérieur d'un même site antigénique.

Cette technique de compétition en phase solide fut introduite par Stone et Nowinski (1980), qui signale cependant que de fausses interprétations sont possibles lorsque deux anticorps d'affinités différentes sont utilisés. En effet, un anticorps de faible affinité compétionnera difficilement avec un anticorps de haute affinité. Il est donc essentiel d'effectuer le test de compétition selon les deux combinaisons possibles anticorps marqué/anticorps non marqué et de se méfier des observations de compétition dans seulement l'une des deux combinaisons.

Le marquage des anticorps monoclonaux est crucial pour l'obtention de résultats clairs au moment de délinéament de sites antigéniques sur les protéines virales. On a d'abord utilisé le marquage radioactif et le test de radio-immunodosage. Toutefois, nous avons souvent observé l'effet négatif d'un tel traitement sur l'activité biologique de l'anticorps. Nous favorisons donc l'approche de type ELISA dans laquelle l'anticorps est conjugué, soit à l'enzyme peroxydase, soit à la biotine. Dans ce dernier cas, la liaison de l'anticorps marqué est détectée à l'aide d'avidine ou de streptavidine préalablement conjuguée à la peroxydase. Il semble d'ailleurs que de telles approches colorimétriques deviennent de plus en plus populaires.

2.1. COUPLAGE DE LA PEROXYDASE À L'ANTICORPS

La technique de Wilson et Nakane (1978) nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Comme matériel de départ, nous utilisons des immunoglobulines (IgG) semi-purifiées par précipitation à 4°C avec un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7.4). De meilleurs résultats peuvent aussi être obtenus en purifiant les immunoglobulines par chromatographie d'affinité sur colonne de Protéine A-Sepharose (Ey *et al.* 1987, Seppälä *et al.* 1981, Manil *et al.* 1986).

1. Dialyser la préparation d'IgG contre un tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0.01 M, pH 9.5.

2. Ajuster à 8 mg IgG (par immunodiffusion radiale dans le cas d'IgG non purifiées ou par un test de quantification des protéines pour des IgG purifiées).

3. Dissoudre 4 mg de peroxydase de raifort (Sigma Chemicals Inc, Type VI) dans 1 mL d'eau distillée.

4. Ajouter à la solution de peroxydase 0.2 mL d'une solution fraîchement préparée de periodate de sodium 0.1 M. Agiter à 25°C pendant 20 min (la solution passera de brune à verte).

5. Dialyser la solution du dérivé aldéhyde de la peroxydase contre un tampon d'acétate de sodium 1 mM, pH 4.4.

6. Amener la solution dialysée du dérivé aldéhyde de la peroxydase à pH 9.0–9.5 en ajoutant 20 µL d'un

tampon carbonate–bicarbonate de sodium 0.2 M, pH 9.5. Ajouter immédiatement les 8 mg d'IgG dans 1 mL de tampon pH 9.5 (voir étapes 1 et 2 ci-dessus). Agiter pendant 2 h à 25°C.

7. Ajouter à ce conjugué peroxydase-IgG sous forme de base de Schiff 0.1 mL d'une solution fraîchement préparée de borohydrure de sodium 4 mg/mL. Laisser incuber pendant 2 h à 4°C.

8. Ajouter un volume égal de glycérol et conserver soit à 4°C avec du merthiolate de sodium 1 mM ou préférablement à –20 ou –70°C.

2. 2. COUPLAGE DE LA BIOTINE À L'ANTICORPS

La technique de Guersdon *et al.* (1979), telle qu'adaptée par Kendall *et al.* (1983) et Mäkelä *et al.* (1987) est utilisée. La préparation des immunoglobulines a été décrite pour le couplage à la peroxydase (voir section 2.1).

1. Dialyser la préparation d'IgG contre un tampon PBS pH 7.4.

2. Ajuster à 1 mg/mL d'IgG.

3. Dissoudre 1 mg/mL de N-hydroxyl-succinimido-biotine dans du N'-N'-diméthylformamide à 25%.

4. Ajouter 194 µL de la solution de biotine à 1 mL de la solution d'IgG. Il s'agit d'un rapport moléculaire biotine:IgG de 90:1, si on assume que chaque molécule d'IgG contient 90 groupements aminés libres. Ce rapport semble être optimal (Kendall *et al.* 1983, Mäkelä *et al.* 1987). Toutefois, il pourrait varier selon l'anticorps monoclonal à biotinyler et il serait alors avantageux de l'optimiser en utilisant entre 50 et 400 µL de la solution de biotine par mL de solution d'IgG, et en testant par la suite la qualité de conjugué obtenu dans le test ELISA décrit ci-après.

5. Incuber à 25°C pendant 3 à 4 h.

6. Dialyser contre du tampon PBS pH 7.4 pendant environ 24 h, en effectuant trois changements de tampon.

7. Ajouter un volume égal de glycérol et conserver à –20 ou –70°C jusqu'à utilisation.

2. 3. TEST DE COMPÉTITION

Le protocole de Talbot *et al.* (1984, 1985) est utilisé lorsque les anticorps monoclonaux sont couplés directement à la peroxydase. Une étape supplémentaire d'addition de peroxydase couplée à la streptavidine est ajoutée lorsque des anticorps biotinylés sont utilisés. Le protocole détaillé du test immunoenzymatique est décrit au chapitre précédent. Seules les modifications seront décrites ici.

1. Préparer des plateaux contenant l'antigène viral et 8 puits d'antigène témoin par dilution d'anticorps monoclonal conjugué à tester.

2. Ajouter la solution de blocage pendant 60 min à 25°C.

3. Ajouter des dilutions d'anticorps compétiteur non-conjugué (1 ng à 5 µg d'IgG) dans un volume de 100 µL et incuber pendant 2 à 20 h à 25°C. L'antigène témoin est conservé dans la solution de blocage.

4. Jeter les solutions contenues dans les puits d'antigène viral et témoin. Laver délicatement une fois avec le tampon de lavage (optionnel).

5. Ajouter 100 µL par puits d'anticorps conjugué à la peroxydase ou à la biotine. La dilution à utiliser a été préalablement établie de façon à ce que l'absorbance finale sans compétition se situe entre 1.0 et 1.5. Les 8 puits d'antigène témoin sont aussi utilisés pour chaque dilution d'anticorps conjugué, de façon à quantifier le bruit de fond de la technique. Il est aussi essentiel de mesurer la liaison de chaque dilution de conjugué à l'antigène viral, en absence d'anticorps compétiteur. Incuber pendant 90 min à 25°C.

6. Vidanger les conjugués et laver les puits trois fois avec le tampon de lavage.

7. Dans le cas des anticorps conjugués à la peroxydase, passer à l'étape 8. Pour ce qui est des anticorps biotinylés, ajouter une dilution appropriée de streptavidine-peroxydase dans un volume de 100 µl par puits. Incuber pendant 90 min à 25°C. Vidanger et laver les puits trois fois avec le tampon de lavage.

8. Ajouter le substrat de la peroxydase pendant 30 min à 25°C et arrêter la réaction avec le HCl 1N. Lire l'absorbance à 492 nm.

Les résultats de compétition sont exprimés en fonction de l'absorbance (A) moyenne observée pour la liaison de chaque dilution de conjugué à l'antigène viral (Av) et témoin (At) en l'absence d'anticorps compétiteur (Ac):

$$\% \text{ compétition} = \frac{Av - Ac}{Av - At} \times 100$$

Ac est l'absorbance observée en présence d'un anticorps compétiteur.

En général, le niveau de compétition par l'anticorps homologue devrait être supérieure à 80%. Un niveau de compétition inférieur à 30% indique un anticorps reconnaissant un site antigénique différent. Des niveaux de compétition intermédiaires sont indicatifs d'épitopes différents mais localisés physiquement assez près l'un de l'autre pour que l'encombrement stérique des immunoglobulines induise une compétition partielle (voir Figure 1).

3. SÉLECTION DE VARIANTS ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les tests de compétition entre anticorps monoclonaux décrits précédemment permettent de définir des sites antigéniques sur les protéines virales et de les corréler avec certaines activités biologiques du virus lorsque ces anticorps monoclonaux peuvent inhiber ces activités (e.g. neutralisation *in vitro*, protection passive *in vivo*, inhibition de l'activité fusogénique ou hémagglutinante, etc.). Une approche complémentaire introduite par Gerhard *et al.* (1978) consiste à utiliser des anticorps monoclonaux neutralisants pour sélectionner des virus ayant perdu par mutation spontanée les épitopes correspondants. Cette approche n'est utilisée que pour les virus à ARN, où l'absence de mécanismes de réparation lors de la réplication de l'ARN produit des erreurs de transcription à une fréquence de 10^{-4} à 10^{-5}. Par conséquent, l'incubation d'une suspension virale avec un anticorps monoclonal neutralisant permettra de sélectionner ces variants antigéniques ayant perdu l'épitope reconnu par cet anticorps et donc n'étant plus neutralisés par celui-ci. Récemment, Iorio et

Bratt (1985) ont proposé une approche alternative utilisant un anticorps anti-immunoglobuline de souris qui pourrait permettre de sélectionner des variants antigéniques ayant perdu un épitope reconnu par un anticorps non neutralisant ou encore faiblement neutralisant. Le protocole suivant fait appel à un anticorps monoclonal neutralisant (Dalziel *et al.* 1986). Les variants obtenus avec une série d'anticorps sont alors étudiés quant à leur réactivité avec les anticorps disponibles de manière à établir une carte antigénique. De plus, les activités biologiques de ces variants peuvent donner des informations sur les relations structure antigénique fonction.

1. Incuber pendant 30–60 min à 37°C une préparation homogène (clonée par prélèvement de plages ou dilution limite) d'une suspension virale concentrée (plus de 10^5 unités infectieuses) avec une dilution d'anticorps monoclonal (en général sous forme de liquide d'ascite) suffisante pour réduire de plus de 4 $\log_{10}$ le titre viral.

2. Ensemencer sur cellules permissives en présence du même anticorps monoclonal, les virus ayant survécu à la neutralisation.

3. Récolter le virus lorsque des foyers d'infection apparaissent et cloner le virus par prélèvement de plages ou dilution limite.

4. Soumettre le virus cloné à un second cycle de sélection (étapes 1, 2 et 3) et recloner deux fois par prélèvement de plages ou par dilution limite.

La sélection d e variants antigéniques ayant perdu leur réactivité pour un anticorps monoclonal neutralisant produit en général des mutations ponctuelles, tel que démontré récemment pour 16 variants du virus parainfluenza humain type 3 (Van Wyke Coelingh *et al.* 1987). Toutefois, il est possible que la modification d'un seul acide aminé dans un épitope entraîne une modification conformationnelle affectant un épitope complètement différent (Dalziel *et al.* 1986). Il est donc essentiel d'analyser la réactivité d'une série d'anticorps monoclonaux avec ces variants.

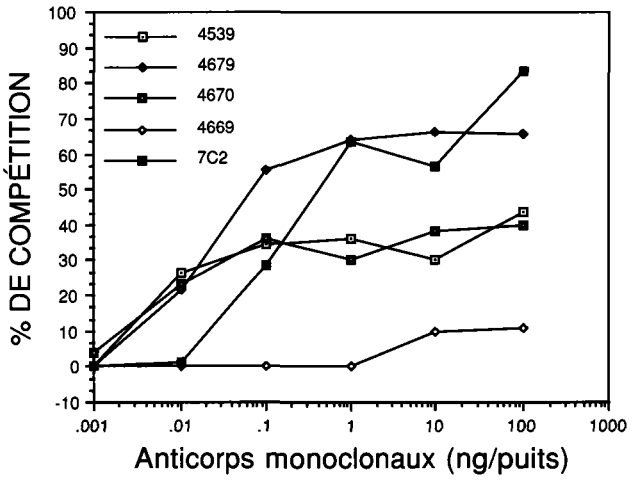


Figure 1

Caractérisation d'un épitope par épreuve de compétition en ELISA entre différents anticorps monoclonaux spécifiques à la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial humain. Les AcMo 7C2 et 4679 sont identiques. Les AcMo 4670 et 4539 ont une identité à 50% alors que le 4669 semble reconnaître un site voisin mais différent.

4. RÉFÉRENCES

Dalziel, R.G., Lampert, P.W., Talbot, P.J. et Buchmeier, M.J. 1986. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. J. Virol. 59: 463-471.

Ey, P.L., Prowse, S.J. et Jenkin, C.R. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein-A Sepharose. Immunochem. 15: 429-436.

Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E. et Webster,R. 1978. Antigenic structure of influenza virus haemaglutinin defined by hybridoma antibodies. Nature (London) 290: 713-717.

Guesdon, J.-L., Ternynck, T. et Avrameas, S. 1979. The use of avidin–biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139.

Iorio, R.M. et Bratt, M.A. 1985. Selection of unique antigenic variants of Newcastle Disease Virus with neutralizing monoclonal antibodies and anti-immunoglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7106-7110.

Kendall, C., Ionescu-Matiu, I. and Dreesman, G.R. 1983. Utilization of the biotine/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Immunol. Methods 56: 329-339.

Lubeck, M.D. et Gerhard, W. 1981. Topological mapping of antigenic sites on the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies. Virology 113: 64-72.

Mäkelä, M.J., Norrby, E. et Salmi, A. 1987. Measurement of polypeptide- and anti-genic- site specific antibodies to measles virus using a competitive enzyme immunoassay. J. Virol. Methods 16: 65-74.

Manil, L., Motté, P., Pernas, P., Troalen, F., Bohuon, C. et Bellet, D. 1986. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. J. Immunol. Methods 90: 25-37.

Seppälä, I., Sarvas, H., Péterfy, F. et Mäkelä, O.. 1981. The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using Protein A-Sepharose. Scand. J. Immunol. 14: 335-342.

Stone, M.R. et Nowinski,R.C. 1980. Topological mapping of murine leukemia virus proteins by competition binding assays with monoclonal antibodies. Virology 100: 370-381.

Talbot, P.J., Salmi,A.A., Knobler,R.L. et Buchmeier,M.J.. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus–4 (strain JHM): correlation with biological activities. Virology 132: 250-260.

Talbot, P.J., Salmi, A.A., Knobler, R.L. et Buchmeier, M.J.. 1985. Epitope-specific antibody response to murine hepatitis virus–4 (strain JHM). J. Immunol. 134: 1217-1224.

Van Wyke Coelingh, R.L., Winter, C.C., Jorgensen, E.D. et Murphy, B.R.. 1987. Antigenic and structural properties of the hemagglutinin/ neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3: sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies which inhibit infectivity, hemagglutination, and neuraminidase activity. J. Virol. 61: 1473-1477.

Wilson, M.B. et Nakane,P.K.. 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxydase (HRPO) to antibodies. In *Immunofluorescence and related staining techniques*. Knapp.W., K.Holubar et G.Wick, (Édit.) Elsevier North Holland, New York pages 215-224.

Yewdell, J.W. et Gerhard,W.. 1981. Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. Ann. Rev. Microbiol. 35: 185-201.

17

HISTOLOGIE ET HISTOCHIMIE

Gilles Lussier

1. INTRODUCTION

Les examens histologiques et histochimiques peuvent être avantageusement utilisés pour le diagnostic de certaines infections virales ou au cours de travaux expérimentaux faisant appel à l'animal de laboratoire ou à des cultures cellulaires. De tels examens permettent de mettre en évidence la morphologie que possédaient les tissus au moment de leur prélèvement. Pour ce faire, plusieurs étapes se succèdent dans la préparation des tissus avant leur coloration pour examen en microscopie photonique. La première consiste à assurer la préservation des structures tissulaires. Une fois cette préservation assurée, il est nécessaire, dans le cas des tissus prélevés chez l'organisme vivant, d'augmenter leur rigidité afin de pouvoir effectuer des coupes minces d'environ 5 µm d'épaisseur permettant le passage de la lumière du microscope. On y arrive soit par congélation, soit par imprégnation du tissu par un matériel solide. La congélation de l'eau dans le tissu entraîne son durcissement; quant à l'imprégnation, elle consiste à remplacer l'eau présente dans les tissus par une substance solide et chimiquement inactive. La paraffine est généralement employée à cette fin. Cependant, comme l'eau et la paraffine ne sont pas miscibles, il est nécessaire d'utiliser des liquides intermédiaires entre l'eau et la paraffine pour, dans un premier temps, enlever l'eau tissulaire et, dans un second temps, remplacer ce liquide par la paraffine. Ce processus, appelé circulation, s'effectue en trois étapes: la déshydratation dans laquelle l'eau est retirée du tissu, l'éclaircissement qui permet le remplacement de l'agent déshydratant par un solvant de la paraffine et finalement l'imprégnation proprement dite dans laquelle la paraffine pénètre le tissu.

Une fois imprégné de paraffine, le tissu est ensuite inclus dans un bloc avant d'être tranché à l'épaisseur désirée au moyen d'un microtome. Quant aux tissus congelés, ceux-ci peuvent être coupés sans imprégnation dans la paraffine directement au moyen d'un microtome spécial (cryotome).

Les coupes ainsi obtenues sont étalées et collées sur des lames de verre puis colorées pour la mise en évidence des éléments que l'on désire étudier. Cependant, afin d'assurer la pénétration des colorants dans les tissus, il faut en retirer

la paraffine et les réimprégner d'eau. Les coupes ainsi colorées sont protégées au moyen d'une lamelle de verre collée sur la coupe.

L'examen des cellules cultivées généralement sur lamelles en tube de Leighton ne nécessite qu'une fixation avant la coloration; dans ce cas, il n'est donc pas nécessaire de les enrober dans la paraffine.

La coloration des tissus peut être divisée en deux grands groupes: les colorations histologiques et les colorations histochimiques. Bien que le mécanisme d'action des premières ne soit pas clairement connu, il permet la mise en évidence des structures micro-anatomiques; le mécanisme d'action des secondes est plus connu et renseigne sur la chimie des tissus.

2. FIXATION DES TISSUS

2.1. GÉNÉRALITÉS

Pour assurer le maintien de la structure morphologique et de l'intégrité chimique des tissus tels qu'elles se présentaient au moment de leur prélèvement, il faut procéder à leur fixation. Cette étape critique de la préparation a pour but d'inactiver les enzymes cellulaires pour éviter ainsi la dénaturation des protéines et de permettre les manipulations nécessaires à la préparation des spécimens histologiques. Les fixateurs les plus couramment employés sont le formol et le liquide de Bouin. À ceux-ci viennent maintenant s'ajouter des mélanges commerciaux d'utilisation facile et efficace.

2.2. FORMALDÉHYDE OU FORMOL

Le formol est l'agent fixateur le plus fréquemment utilisé. Il pénètre bien et ne durcit pas trop les tissus qui peuvent ainsi être conservés longtemps sans détérioration. Il est acheté en solution aqueuse saturée contenant 40% de formaldéhyde. On considère cette solution comme du formol à 100% et on l'utilise en solution aqueuse saline ou tamponnée à 10% (4% de formaldéhyde).

Formol à 10% salin

Eau distillée ..... 90 mL

Chlorure de sodium ..... 0.85 à 0.90 g

Formol concentré ..... 10 mL

Formol à 10% tamponné

Formol concentré ..... 10 mL

Phosphate monosodique anhydre (NaH_2PO_4) ..... 0.35 g

Phosphate disodique anhydre (Na_2HPO_4) ..... 0.65 g

Eau distillée, compléter à ..... 100 mL

2.3. MÉLANGE DE BOUIN

Ce mélange est assez largement utilisé comme fixateur de routine. Il pénètre les tissus et il est très efficace pour la mise en évidence des corps d'inclusion de type viral.

Solution aqueuse saturée d'acide picrique (1.22%) ..... 75 mL

Formol du commerce à 40% ..... 25 mL

Acide acétique glacial ..... 5 mL

2.4. CARNOY

Ce mélange peut être avantageusement utilisé pour la fixation des petites pièces. En raison de sa rapidité à fixer, des pièces de 2 à 3 mm peuvent être fixées en une quinzaine de minutes.

Éthanol absolu ..... 60 mL

Chloroforme ..... 30 mL

Acide acétique glacial ..... 10 mL

2.5. SUSA DE HEIDENHAIN

Ce mélange est également un fixateur à action rapide. Les pièces d'épaisseur de 3 mm ou moins peuvent être fixées en moins de 2 à 3 h.

Chlorure mercurique ..... 4.5 g

Chlorure de sodium ..... 0.5 g

Acide trichloroacétique ..... 2.0 g

Acide acétique glacial ..... 4 mL

Formol concentré ..... 20 mL

Eau distillée, compléter à ..... 100 mL

2.6. FIXATEURS COMMERCIAUX

Plusieurs fabricants ont mis sur le marché des solutions déjà préparées qui donnent d'excellents résultats pour les colorations de routine. C'est le cas, entre autres, du Perfix® et du Tissufix®.

3. IMPRÉGNATION

Afin d'être en mesure d'obtenir des coupes minces dont l'épaisseur varie habituellement entre 3 et 6 µm, il s'avère nécessaire d'augmenter la rigidité du tissu. Deux moyens peuvent être utilisés à cette fin: la congélation et l'imprégnation du tissu par un matériau solide appelé milieu d'inclusion ou préférablement milieu d'imprégnation. En pratique, le milieu d'imprégnation le plus couramment utilisé est la paraffine. Celle-ci n'est toutefois pas miscible à l'eau d'où la nécessité d'utiliser des liquides intermédiaires qui sont miscibles avec l'eau, pouvant ainsi chasser l'eau du tissu et qui sont de plus miscibles avec la paraffine, permettant à cette dernière de pénétrer le tissu.

3.1. LA DÉSHYDRATATION

La première étape consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Parmi les nombreux produits pouvant être utilisés, l'éthanol est le plus couramment employé. Afin d'éviter une trop rapide rétraction du tissu et conséquemment sa distorsion, il faut procéder graduellement. La déshydratation se fait généralement par un passage du tissu dans des bains successifs en débutant avec de l'éthanol à 70% et en augmentant la concentration de 10% à la fois pour arriver au dernier bain d'éthanol absolu.

3.2. ÉCLAIRCISSEMENT

L'éthanol n'étant pas miscible avec la paraffine, il est nécessaire de le remplacer dans le tissu par un solvant de celle-ci. De nombreux solvants peuvent être utilisés comme agents éclaircissants, les plus couramment utilisés sont les hydrocarbures benzéniques: le toluène, le benzène ou le xylène.

3.3. IMPRÉGNATION

La paraffine est l'agent le plus fréquemment utilisé. Les entreprises commerciales spécialisées dans la fourniture de matériel histologique produisent leur propre marque de paraffine à laquelle sont ajoutées diverses substances destinées à améliorer l'efficacité du produit.

Les diverses manipulations relatives à la déshydratation, à l'éclaircissement et à l'imprégnation se font au moyen d'un appareil à circulation automatique dont il en existe différents modèles sur le marché.

4. ENROBAGE

L'enrobage consiste à inclure, dans un bloc fait de milieu d'inclusion, le tissu qui est déjà imprégné. La paraffine est généralement utilisée à cette fin. Ce bloc permet une manipulation plus facile du tissu qui peut ainsi être attaché à la pince porte-objet du microtome pour permettre la préparation des coupes minces.

5. CRYOTOMIE

On a recours à la congélation lorsqu'il est impossible d'utiliser l'inclusion à la paraffine pour la coupe; par exemple, lorsque l'on doit travailler sur des tissus frais, non fixés, pour effectuer des études d'immunofluorescence. On utilise également la coupe en congélation lorsque certaines étapes préparatoires à l'inclusion à la paraffine sont susceptibles d'éliminer les substances que l'on désire mettre en évidence. C'est le cas, par exemple, des lipides qui sont dissous par les solvants utilisés lors de la circulation des tissus. Il est préférable de congeler les tissus à une température inférieure à –20°C; cela peut se faire à l'aide de CO_2, de fréon ou d'azote liquide.

6. COLORATION DES COUPES

Il existe deux étapes préparatoires à la coloration proprement dite: ce sont le déparaffinage et l'hydratation.

6.1. ÉTAPES PRÉPARATOIRES

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu afin de permettre la pénétration des colorants. Le xylène est utilisé à cette fin; on fait passer les coupes dans deux bains de xylène pendant 3 à 5 min. La pénétration des colorants utilisés, qui sont pour la plupart en solution aqueuse, ne peut se faire que si les tissus ont été imprégnés d'eau. L'hydratation a donc pour effet de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par de l'eau. L'éthanol est alors utilisé en concentrations décroissantes en commençant par deux bains d'éthanol absolu, puis suivis de bains à 95%, à 80% et à 70%, tous d'une durée de 3 à 5 min. On termine l'hydratation par un traitement de 3 à 5 min à l'eau courante. Il est important de ne pas laisser sécher les tissus depuis le début du déparaffinage jusqu'au moment où la coupe est montée.

6.2. COLORATION PROPREMENT DITE

Les nombreux types de coloration peuvent être regroupés en deux grandes catégories: la coloration de routine et les colorations spéciales. Alors que la première suffit à mettre en évidence les cytoplasmes, les noyaux et les fibres de collagène, les secondes sont utilisées pour mettre en évidence des éléments tissulaires spéciaux. Il existe un très grand nombre de méthodes de coloration de routine et de coloration spéciale. Nous ne décrirons que les plus courantes susceptibles d'être employées en histopathologie virale.

6.3. COLORATION DE ROUTINE À L'HÉMATOXYLINE-ÉOSINE

Solutions

Alcool acide

Alcool éthylique à 70% ..... 1000 mL

Acide chlorhydrique concentré ..... 5 mL

Eau ammoniacale

Eau distillée ..... 1000 mL

Ammoniaque ..... 2 mL

Eosine Y

Éosine, solution aqueuse à 3% 100 mL

Alcool éthylique à 95% ..... 125 mL

Eau distillée ..... 375 mL

Acide acétique glacial ..... 2 gouttes

Hématoxyline de Harris

Hématoxyline ..... 5 g

Éthanol ..... 50 mL

Eau distillée ..... 950 mL

Alun de potasse ..... 100 g

Oxyde mercurique ..... 2.5 g

Acide acétique glacial ..... 40 mL

Dissoudre l'alun dans l'eau et l'hématoxyline dans l'éthanol. faire chauffer séparément, puis mélanger les deux solutions et porter le mélange à ébullition. Retirer du feu, ajouter lentement l'oxyde mercurique et remettre sur le feu jusqu'à l'obtention d'une couleur violet foncé puis laisser bouillir de 3 à 5 min. Faire refroidir, ajouter l'acide acétique et filtrer. La solution peut être conservée de 3 à 6 mois; filtrer avant usage.

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Colorer avec l'hématoxyline de Harris (15 min).
4. Laver à l'eau du robinet.
5. Différencier dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); déposer ensuite la lame dans un bain d'eau du robinet et vérifier au microscope la différenciation. Les noyaux doivent être rouges et le fond clair.
6. Laver à l'eau du robinet (2 à 3 min).
7. Bleuir dans l'eau ammoniacale.
8. Laver à l'eau du robinet (15 min).
9. Colorer dans la solution d'éosine (15 sec à 2 min). (L'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'intensité de l'acidophilie des divers éléments cellulaires).
10. Déshydrater et monter.

Résultats

- Noyaux: bleu
- Cytoplasme: rose
- Fibres conjonctives (particulièrement le collagène): rose tirant sur l'orangé
- Globules rouges: rouge clair à jaune

6.4. MISE EN ÉVIDENCE DES GLUCIDES (MÉTHODE À L'ACIDE PERIODIQUE-SCHIFF)

Solutions

Réactif de Schiff

Fuchsine basique ..... 1 g

Eau distillée ..... 200 mL

Acide chlorhydrique 1 N ..... 20 mL

Métabisulfite de sodium ou de potassium ..... 1 g

Charbon activé en poudre ..... 2 g

Dissoudre la fuchsine basique dans l'eau distillée et laisser bouillir (5 min). Refroidir à 50°C et filtrer la solution. Ajouter l'acide chlorhydrique 1 N au filtrat et refroidir à 25°C. Ajouter le métabisulfite (Na ou K). Laisser reposer à la noirceur (18 à 24 h). Ajouter le charbon activé. Brasser (1 min). Filtrer la solution et la conserver au réfrigérateur. Cette solution peut être conservée dans une bouteille ambre bien bouchée; elle doit être limpide et ne doit pas être utilisée lorsqu'elle prend une teinte rosée.

Eau sulfureuse

Acide chlorhydrique 1 N (8.35 mL HCl à 100 mL dans H_2O) ..... 5 mL

Bisulfite de sodium ou de potassium à 10% dans H_2O ..... 6 mL

Eau distillée ..... 100 mL

Acide periodique à 1%

Acide periodique ..... 1 g

Eau distillée ..... 100 mL

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet (10 min).
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Oxyder avec l'acide periodique à 10% (15 min).
4. Laver à l'eau courante (10 min).
5. Rincer à l'eau distillée.
6. Colorer avec le réactif de Schiff préalablement filtré (Whatman No 1) (15 min).
7. Passer à l'eau sulfureuse pour enlever le réactif de Schiff en excès (3 bains de 2 min chacun).
8. Laver à l'eau du robinet (10 min).
9. Colorer les noyaux avec l'hématoxyline de Harris en doublant le temps normal.
10. Laver à l'eau de robinet (10 min).
11. Déshydrater et monter.

Résultats

- Substances positives: rose à rouge-pourpre
- Noyaux: bleu
- Fond: teinte vert pâle

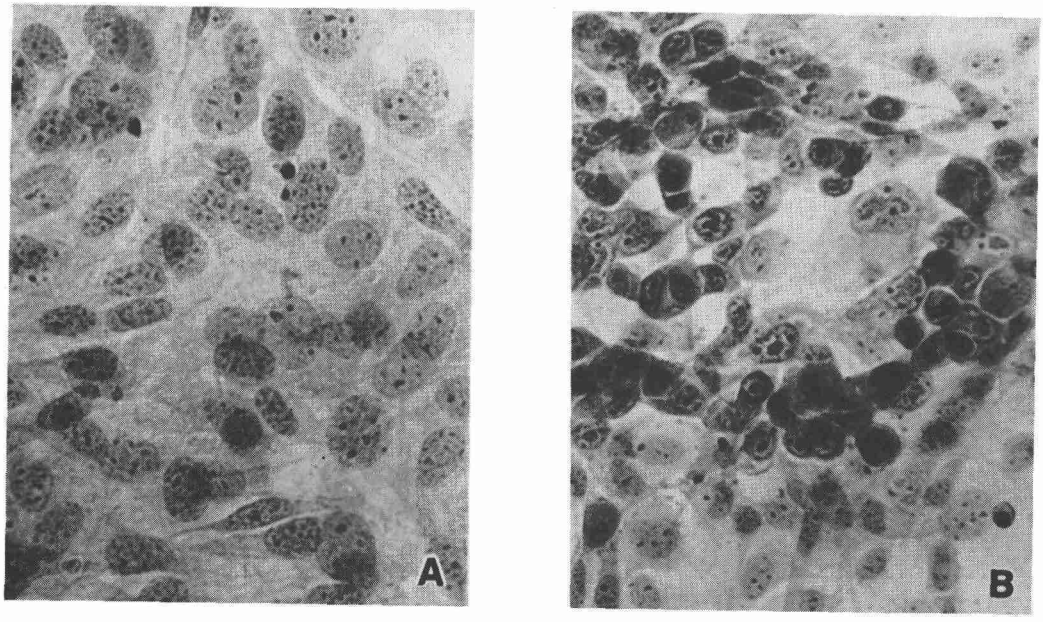


Figure 1

Feuillet de cellules d'embryons de souris colorées à l'hématoxyline et à l'éosine

Cellules non infectées (A) et cellules avec corps d'inclusion intranucléaires (B).

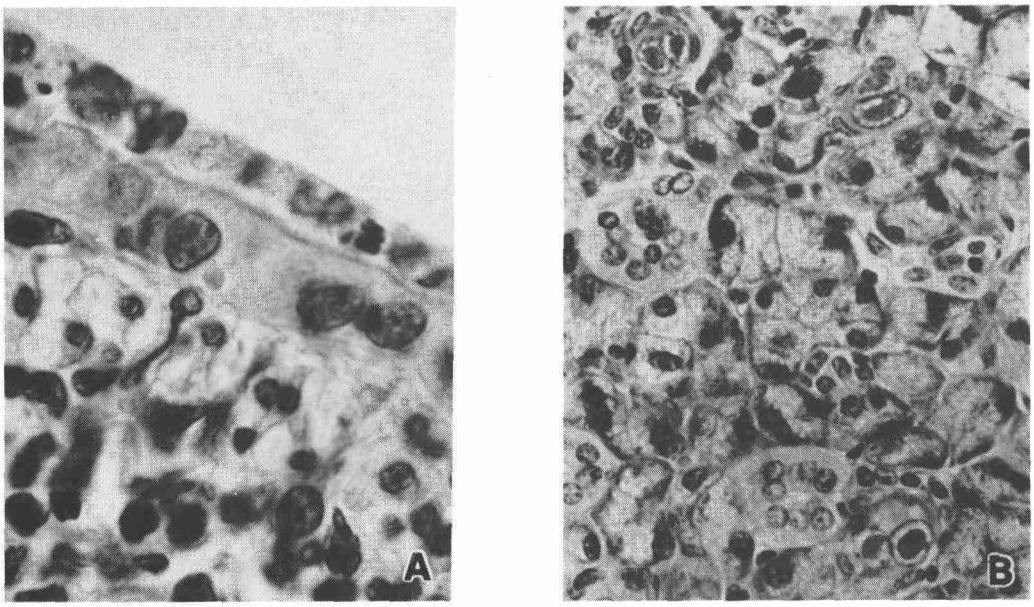


Figure 2

A) Coupe de poumon (coloration hématoxyline et éosine) mettant en évidence la présence d'une inclusion intracytoplasmique au niveau d'une cellule épithéliale bronchique.

B) Coupe de glandes salivaires (coloration hématoxyline et éosine) mettant en évidence la présence de corps d'inclusion intranucléaires.

6.5. MISE EN ÉVIDENCE DES LIPIDES (MÉTHODE À L'HUILE ROUGE O)

Solutions

Solution de réserve saturée d'huile rouge O

Huile rouge O ..... 0.5 g

Alcool isopropylique (isopropanol) à 99% ..... 100 mL

Solution de travail d'huile rouge O

Solution saturée de réserve d'huile rouge O ..... 6 mL

Eau distillée ..... 4 mL

Mélanger, agiter 15 à 20 sec et laisser reposer 10 min. Filtrer juste avant l'usage. L'huile rouge O diluée n'est utilisable que pendant 1 à 2 h.

Méthode

1. Déposer les coupes en congélation dans un bain d'eau courante pour enlever les résidus de fixateur et laver pendant 5 min en changeant les bains.
2. Colorer avec la solution de travail d'huile rouge O (10 min).
3. Laver à l'eau du robinet en agitant pour enlever le surplus de colorant.
4. Contrecolorer les lames à l'hématoxyline de Harris (1 min).
5. Laver à l'eau du robinet (5 min) et monter.

6. Bleuir les noyaux par un passage dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium (30 sec).

7. Laver à l'eau du robinet (5 min).

8. Monter.

Résultats

- Lipides: rose
- Noyaux: bleu

Remarque: Il est important d'obtenir les coupes de tissu par cryotomie afin d'éviter l'enrobage dans la paraffine qui aurait pour effet d'extraire les lipides du tissu. Cette coloration peut être utilisée pour la mise en évidence des corps d'inclusion produits par certains poxvirus, notamment les poxvirus aviaires.

6.6. MISE EN ÉVIDENCE DES ACIDES NUCLÉIQUES

6.6.1. Méthode de Feulgen et Rossbeck

La fixation joue un rôle important et influe subséquemment sur le temps d'hydrolyse du tissu. Les agents fixateurs suivants peuvent, entre autres, être utilisés: le Carnoy, le Susa de Heidenhain et l'éthanol absolu.

Solutions

Acide chlorhydrique 1 N

HCl concentré ..... 83.5 mL

H_2O ..... à 1000 mL

Réactif de Schiff (décrit en 6.4)

Eau sulfureuse (décrite en 6.4)

Vert lumière à 0.25% dans H_2O

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater à l'eau du robinet.

2. Rincer à l'eau distillée.

3. Hydrolyser les coupes dans l'acide chlorhydrique 1 N préalablement chauffé à 60°C. La durée de l'hydrolyse doit être ajustée en fonction du fixateur employé. Pour le Carnoy, 6 min; pour le Susa de Heidenhain, 18 min et pour l'éthanol absolu, 5 min.

4. Rincer à l'eau distillée froide pour arrêter l'hydrolyse.

5. Placer les coupes dans le réactif de Schiff (60 à 90 min).

6. Rincer dans trois bains d'eau sulfureuse (2 min par bain).

7. Laver à l'eau courante.

8. Rincer à l'eau distillée.

9. Contrecolorer dans la solution de vert lumière (1 min).

10. Rincer à l'eau distillée.

11. Déshydrater et monter.

Résultats

- ADN: mauve-violet
- Fond (cytoplasme et fibres): vert

6.6.2. Méthode à l'acridine orange

L'éthanol est le fixatif de choix; il est supérieur au formol et au Bouin.

Solutions

Acridine orange (solution de réserve) à 1% dans H_2O

Acridine orange (solution de travail)

Solution de réserve ..... 1 mL

Tampon phosphate (pH 6.0) ..... 1 mL

Chlorure de calcium (0.1 M) 11.1 g/ 100 mL d'H_2O

Méthode

1. Rincer les lamelles à l'eau distillée.
2. Passer rapidement dans l'eau acétique à 1% (10 sec).
3. Laver à l'eau distillée (2 min).
4. Colorer avec la solution de travail d'acridine orange (3 min).
5. Laver dans le tampon phosphate à pH 6 (1 min).
6. Différencier avec la solution de chlorure de calcium (30-60 sec).
7. Laver dans le tampon phosphate.
8. Monter.

Résultats

- ADN: jaune verdâtre
- ARN: rouge

6.7. MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES

6.7.1. Mise en évidence des bactéries par la méthode de Gram selon Brown et Brenn

Solutions

Violet cristal à 1% dans H_2O

Bicarbonate de sodium à 5% dans H_2O

Iode de Gram (solution iodo-iodurée)

Iode ..... 1 g

Iodure de potassium ..... 2 g

Eau distillée ..... 300 mL

Solution de réserve de fuchsine basique à 0.25% dans H_2O

Solution de travail de fuchsine basique

Fuchsine basique, solution de réserve ..... 10 mL

Acétone ..... 100 mL

Acide picrique à 0.1% dans l'acétone

Solution d'acétone-toluène (1:1)

Solution d'éther-acétone (1:1)

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Préparer le mélange colorant au moment de l'emploi (pour une lame): à 2 mL de violet de cristal à 1%, ajouter 10 gouttes de bicarbonate de sodium à 5% et agiter lentement les

deux solutions, mettre sur la coupe et laisser agir 1 min.

4. Laver à l'eau du robinet.
5. Immerger la coupe d'iode de Gram (1 min).
6. Rincer à l'eau du robinet et bien assécher la lame.
7. Décolorer avec la solution d'éther-acétone en la versant goutte à goutte sur la coupe pour enlever le surplus de colorant (5 à 10 sec).
8. Colorer avec la solution de travail de fuchsine basique (1 min).
9. Rincer à l'eau du robinet; sécher la lame à l'air pour enlever le surplus d'eau.
10. Plonger dans l'acétone.
11. Différencier dans le mélange acide picrique-acétone jusqu'à l'obtention d'une couleur jaunâtre-rosée.
12. Rincer en agitant la lame dans l'acétone.
13. Rincer brièvement dans le mélange acétone-toluène.
14. Eclaircir au toluène et monter.

Résultats

- Bactéries Gram+: bleu
- Bactéries Gram–: rouge
- Noyaux: rouge
- Autres éléments tissulaires: jaune

6.7.2. Mise en évidence des mycobactéries par la méthode de Ziehl-Neelsen

Solutions

Fuchsine de Steinken

Fuchsine basique ..... 2.5 g

Éthanol à 100% ..... 25 mL

Phénol ..... 12.5 mL

Eau distillée ..... 250 mL

Alcool-acide à 1%

Acide chlorhydrique ..... 3 mL

Éthanol à 95% ..... 297 mL

Bleu de méthylène de Loefler, solution de réserve

Bleu de méthylène de Loefler ..... 1.4 g

Éthanol à 95% ..... 100 mL

Bleu de méthylène de Loefler, solution de travail

Solution de réserve ..... 10 mL

Eau courante ..... 90 mL

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Colorer avec le fuchsine de Steinken (30 min).
3. Laver à l'eau du robinet (5 min).
4. Différencier les coupes avec l'alcool-acide à 1% (1 min).
5. Laver à l'eau du robinet (5 min).

6. Colorer avec le bleu de méthylène de Loefler (8 sec).
7. Rincer à l'eau du robinet (15 sec).
8. Déshydrater rapidement et monter.

Résultats

- Bacilles acido-alcoolo-résistants: rouge
- Éléments tissulaires: bleu très pâle.

6.7.3. Mise en évidence des champignons par la méthode de Grocott

Solutions

Méthénamine à 3% dans H_2O

Borax (borate de sodium) à 5% dans H_2O

Nitrate d'argent à 5% dans H_2O

Solution de méthénamine d'argent

Méthénamine à 3% ..... 25 mL

Eau distillée ..... 25 mL

Borax ..... 2 mL

Nitrate d'argent à 5% ..... 1.2 mL

Acide chromique (trioxyde de chrome) à 5% dans H_2O

Bisulfite de sodium ($NaHSO_3$) à 1% dans H_2O

Chlorure d'or (chloroaurate de sodium) 1% dans H_2O

Thiosulfate de sodium 5% dans H_2O

Vert lumière

Vert lumière SF ..... 0.2 g

Eau distillée ..... 500 mL

Acide acétique glacial ..... 1 mL

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater à l'eau du robinet
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Oxyder dans l'acide chromique à 5% (1 h).
4. Laver à l'eau du robinet (10 min).
5. Rincer à l'eau distillée.
6. Blanchir dans le bisulfite de sodium à 1% (1 min).
7. Laver à l'eau du robinet (3 min).
8. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée.
9. Imprégner par la solution de méthénamine d'argent à 60°C (30 à 60 min).
10. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée.
11. Virer avec le chlorure d'or 1/500 (5 min).
12. Rincer à l'eau distillée.
13. Fixer au thiosulfate de sodium à 5% (2 min).
14. Laver à l'eau du robinet (3 min).
15. Rincer à l'eau distillée.
16. Contrecolorer avec le vert lumière (2 min).
17. Rincer à l'eau distillée.
18. Déshydrater et monter.

Résultats

- Champignons: noir (contour) et grisâtre (partie interne)
- Éléments tissulaires: vert

6.7.4. Mise en évidence des inclusions virales par la méthode à la phloxine-tartrazine de Lendrum

Solutions

Solution d'hématéine de Mayer

Hématoxyline ..... 1 g

Iodate de sodium ..... 0.2 g

Alun de potasse ou d'aluminium ..... 50 g

Acide citrique ..... 1 g

Eau distillée ..... 1 L

Solution de phloxine B

Phloxine B ..... 1 g

Éthanol à 70% ..... 200 mL

Chlorure de calcium ..... 1 g

Solution saturée de tartrazine dans le monoéther éthylique d'éthylène glycol.

Méthode

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Colorer dans l'hématéine de Mayer (5 à 10 min).
3. Bleuir à l'eau du robinet (10 min).
4. Colorer dans la solution phloxine B (30 min).
5. Rincer brièvement dans l'eau distillée.
6. Recouvrir les coupes de la solution de tartrazine en déposant celle-ci goutte à goutte à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'à l'obtention d'un changement de couleur (30 à 60 sec).
7. Placer les coupes dans l'eau distillée et vérifier la différenciation.
8. Déshydrater dans des bains d'éthanol à 60, 90 et 100%.
9. Eclaircir au toluène et monter.

Résultats

- Corps d'inclusion: rouge
- Noyaux: bleu
- Éléments tissulaires: jaune.

Remarque: La taille des virus ne permet pas leur visualisation en microscopie photonique. Par contre leur agglomération ou la production de divers composants intracytoplasmiques ou intranucléaires peuvent servir à détecter la présence d'une infection virale. Les corps de Negri observés dans la rage en sont un exemple. Les diverses inclusions virales ont des affinités tinctoriales variables et leur mise en évidence peut également être obtenue en utilisant la coloration de routine à l'hématéine de Harris par exemple.

7. COLORATION DE CELLULES SUR LAMES ET LAMELLES

Afin de mettre en évidence la morphologie cellulaire et la présence d'inclusions dans les cellules infectées par certains virus, il peut être utile de procéder à leur coloration. À cette fin on utilise généralement l'hématoxyline et l'éosine ou le May-Gruënwald-Giemsa.

7.1. COLORATION À L'HÉMATOXYLINE-ÉOSINE

Méthode

1. Rincer les cultures trois fois dans le PBS. Les cellules infectées doivent être manipulées avec précaution.
2. Fixer dans le Bouin ou le Carnoy (20 min).
3. Rincer à l'eau du robinet.
4. Déshydrater dans l'éthanol à 70% (2 min).
5. Rincer à l'eau du robinet.
6. Colorer à l'hématoxyline (2 min).
7. Différencier dans l'hydroxide d'ammonium (3 à 5 sec).
8. Contrecolorer à l'éosine (1 min).
9. Rincer deux fois à l'eau distillée (30 sec).
10. Déshydrater rapidement par deux passages dans l'éthanol absolu.
11. Effectuer deux passages dans le xylène (1 min chacun).
12. Monter sur lame.

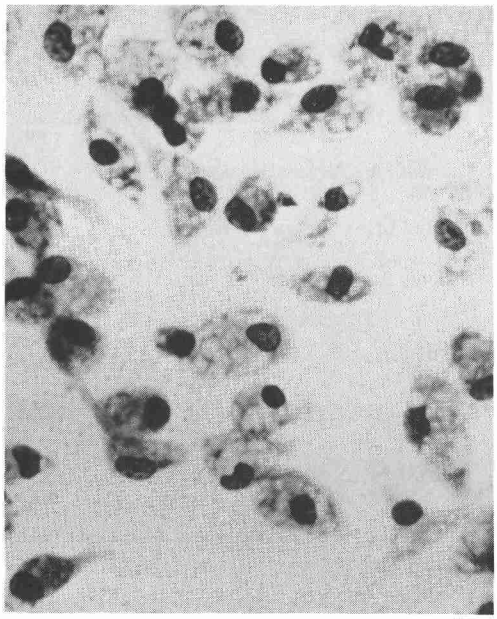


Figure 3

Frottis de macrophages péritonéaux colorés au May-Grüenwald-Giemsa.

7.2. COLORATION AU MAY-GRUËNWALD-GIEMSA

Solutions

May-Gruënwald

Alcool méthylique ..... 400 mL

May-Gruënwald ..... 1 g

Bien dissoudre le May-Gruënwald dans l'alcool méthylique et filtrer avant l'usage.

Giemsa (solution de réserve)

Alcool méthylique ..... 375 mL

Glycérine ..... 250 mL

Giemsa ..... 3.8 g.

Mélanger l'alcool méthylique et la glycérine, puis ajouter le Giemsa. Bien mélanger et laisser reposer dans une étuve 60°C pendant 48 h. Filtrer avant usage.

Solution de travail de Giemsa

Solution de réserve .....7 gouttes

Eau distillée .....5 mL

Eau acétique à 1% dans H_2O

Éthanol-formol à 10%

Alcool éthylique à 90% .....90 mL

Formaldéhyde du commerce à 40% .....10 mL

Méthode

1. Rincer les cultures trois fois dans le PBS.
2. Fixer dans l'éthanol absolu (5 min).
3. Passer à l'éthanol-formol à 10% (5 min).
4. Hydrater à l'eau du robinet (5 min).
5. Laver à l'eau distillée (10 min).
6. Colorer au May-Gruënwald-Giemsa en appliquant 20-25 gouttes directement sur la lamelle pendant 90 sec.
7. Colorer avec la solution de travail Giemsa (15 min) puis rincer à l'eau distillée.
8. Différencier dans l'eau acétique à 1% (20 sec) puis rincer à l'eau distillée.
9. Passer rapidement à l'éthanol.
10. Passer dans quatre bains de toluène.
11. Monter.

8. CYTOLOGIE EXFOLIATRICE

La cytologie exfoliatrice s'apparente à l'histologie par les méthodes employées. Elle est principalement utilisée comme moyen de dépistage de plusieurs types de cancers ou pour l'obtention de renseignements sur l'état gynécologique de la femme. La cytologie exfoliatrice est également utile pour le diagnostic de certaines infections virales.

8.1. PRÉLÈVEMENT DES SPÉCIMENS

Les méthodes de collecte varient suivant l'organe examiné. Les spécimens peuvent être prélevés par grattage au moyen d'une spatule, par aspiration au moyen d'une pipette, d'une seringue ou à l'aide d'un écouvillon.

8.2. PRÉPARATION DES FROTTIS

Les frottis peuvent être effectués par étalement du prélèvement directement sur une lame; cependant s'ils doivent être préparés à partir de matériel liquide, on doit procéder à la concentration des éléments cellulaires par centrifugation ou par filtration sur membranes. Dans le cas de la centrifugation, les frottis sont faits à partir du culot; dans le cas de la filtration, ils sont préparés en appuyant le filtre directement contre la lame.

8.3. LA FIXATION

Les cellules peuvent être fixées dans le Bouin, le Carnoy ou l'éthanol à 90%. Il est important d'éviter la dessiccation des tissus avant et après leur fixation. Si les lames ne peuvent être colorées immédiatement après fixation, elles doivent demeurer dans le fixateur ou être recouvertes d'un enduit prévenant l'évaporation. À cette fin, on peut utiliser la glycérine ou le propylène glycol qui sont hydrosolubles et peuvent ainsi être en-

levés au moment de la coloration. Il existe également des produits commerciaux comme le Cytospray® à base d'alcool isopropylique et de polyéthylène-glycol contenant à la fois le fixateur et l'enduit. Ces produits peuvent être vaporisés directement sur la lame et sont particulièrement utiles dans le cas des frottis qui doivent être acheminés au laboratoire.

8.4. COLORATION DES FROTTIS CYTOLOGIQUES

Plusieurs techniques de coloration peuvent être utilisées telles que la méthode à l'hématoxyline-éosine, le May-Gruënwald-Giemsa et la réaction de Feulgen. Cependant, la méthode de choix est celle de Papanicolaou.

8.4.1. Méthode de Papanicolaou

Solutions

Hématoxyline de Harris (section 6.3)

Alcool-acide

Éthanol ..... 495 mL

Acide chlorhydrique à 1% ..... 5 mL

Ammoniaque-éthanol à 70%

Éthanol à 70% ..... 485 mL

Hydroxyde d'ammonium ..... 15 mL

Orange G

Orange G ..... 0.5 g

Acide phosphotungstique ..... 0.015 g

Éthanol à 95% ..... 100 mL

EA-50

Vert lumière à 0.1% dans l'éthanol à 95% ..... 45 mL

Éosine à 0.5% dans l'éthanol à 95% ..... 45 mL

Brun de Bismarck à 0.5% dans l'éthanol à 95% ..... 45 mL

Acide phosphotungstique ..... 0.2 g

Solution saturée de carbonate de lithium ..... 1 goutte

Méthode

1. Plonger dans l'éthanol à 95% (1 min).
2. Plonger dans l'éthanol à 70% (2 min).
3. Rincer à l'eau distillée (3 min).
4. Colorer à l'hématoxyline (2 min).
5. Rincer à l'eau du robinet (1 min).
6. Rincer à l'eau distillée (1 min).
7. Plonger dans l'alcool-acide (3 sec).
8. Plonger dans l'ammoniaque-éthanol à 70% (30 sec).
9. Rincer à l'eau du robinet (2 min).
10. Plonger dans l'éthanol à 70% (2 min).
11. Plonger dans l'éthanol à 95% (2 min).
12. Colorer à l'orange G (1 min).
13. Plonger dans l'éthanol à 95% (30 sec).

14. Plonger dans l'éthanol à 95% (30 sec).
15. Colorer dans le colorant cytoplasmique EA-50 (90 sec).
16. Plonger dans l'éthanol à 95% (30 sec),
17. Plonger dans l'alcool absolu (1 min).
18. Plonger dans l'éthanol absolu (1 min).
19. Plonger dans l'éthanol absolu-toluène (50-50) (2 min).
20. Plonger dans trois bains de toluène (2 min par bain) puis monter.

Résultats

- Noyaux: bleu
- Cytoplasme des cellules profondes: vert-bleu
- Cytoplasme des cellules superficielles: rose
- Globules rouges: orange

9. MONTAGE

Cette opération effectuée après la coloration consiste à fixer, à l'aide d'une résine, une lamelle de verre sur l'échantillon histologique pour assurer la permanence de la préparation. Il existe un grand nombre de milieux de montage sur le marché; les plus utilisés sont l'Eukitt®, le Permount®, l'Immu-mount®, le Harleco® et le Malinol®.

10. RÉFÉRENCES

Bancroft, J.D. et Cook, H.C. 1984.*Manual of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, New York.

Culling, C.F.A. 1974. *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*, 3e éd., Butterworth, Londres.

Ganter, P. et Jollès, G. 1970. *Histochimie normale et pathologique* (tome II), Gauthiers-Villars, Paris.

Hould, R. 1984.*Techniques d'histopathologie et de cytologie*, Décarie, Montréal.

Lillie, R.D et Fullmer, H.M. 1976. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 4e éd., McGraw-Hill, New York.

Sheehan, D.C. et Hrapchak, B.B. 1980. *Theory and Practice of Histochemistry*, 2e éd., C.V. Mosby, Saint-Louis.

18

L'OR COLLOÏDAL, COMME MARQUEUR EN VIROLOGIE

Simon Garzon

L'introduction de l'or colloïdal comme marqueur ou traceur en microscopie électronique a révolutionné la cytochimie et l'immunohistochimie ultrastructurales. Ce marqueur est aujourd'hui largement appliqué, souvent de préférence à la ferritine ou à la peroxydase. Son application s'étend de la localisation des sites antigéniques (méthode d'immuno–or colloïdal), de substrats enzymatiques (méthode enzyme-or) et/ou de groupements hydrates de carbone (méthode lectine-or) à la localisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'aide de sonde d'ADN et d'ARN (méthode d'hybridation *in situ*) tant en biologie cellulaire qu'en microbiologie ou en virologie.

L'or colloïdal présente de nombreux avantages. Très dense aux électrons et de taille bien définie, on peut se le procurer dans une gamme variée de diamètres, ce qui permet des localisations doubles ou triples. Les méthodes de préparation de suspensions stables d'or colloïdal de diamètre standardisé sont maintenant bien établies. D'autre part, l'or chargé négativement, se lie à différentes macromolécules, telles les protéines et lipoprotéines par de simples liaisons électrostatiques. De plus, il donne un complexe stable sans altération de l'activité biologique de la macromolécule ainsi couplée. Finalement, sa densité, sa couleur caractéristique rouge et sa capacité d'absorber la lumière visible ou d'émettre une forte émission d'électrons secondaires en ont fait un marqueur universel adapté autant aux méthodes d'immuno-empreinte qu'à la microscopie optique ou à la microscopie électronique à transmission ou à balayage. Cependant, seules les particules d'or de faible diamètre peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules pour marquer les macromolécules intracellulaires ce qui limite son utilisation en méthode de préenrobage, principalement à la localisation des macromolécules de surface des membranes cytoplasmiques. Par contre, en méthode de postenrobage, les complexes protéines-or permettent la localisation des macromolécules intra-

cellulaires directement sur coupes ultrafines.

La spécificité et la sensibilité des méthodes à l'or vont dépendre:

- de la qualité et de la stabilité des complexes-or
- de l'activité spécifique des anticorps (affinité et avidité), des enzymes ou des autres macromolécules utilisées
- de la préservation de l'activité biologique ou antigénique de la macromolécule cible
- de l'accessibilité de la macromolécule cible
- du blocage des groupements non spécifiques
- et des forces électrostatiques, qui dans les méthodes de post-enrobage, peuvent interférer avec le marquage spécifique et donner un bruit de fond élevé.

Ces différentes considérations ont conduit à la mise au point d'un éventail de méthodes de marquage selon les propriétés et l'accessibilité de chaque macromolécule à localiser. On suggère la lecture des différents articles de revue cités en référence. Ces méthodes qui permettent une bonne préservation de l'ultrastructure donnent un marquage ponctuel qui n'obscurcit pas la structure fine d'où leur grand intérêt en microbiologie et en virologie. Conjointement à l'avènement des anticorps monoclonaux et des sondes d'ADN complémentaires (ADNc) elles permettront de pénétrer l'intimité la plus profonde et le mode de multiplication des virus. Déjà, plusieurs études ont permis l'application des méthodes à l'or colloïdal à la détection et à l'identification des virus par imprégnation négative, la localisation dans la cellule hôte, des protéines virales structurales ou non structurales, et l'étude du transfert des glycoprotéines virales ainsi qu'à la réponse cellulaire.

La première partie de ce chapitre portera sur les méthodes de préparation de l'or colloïdal et des complexes-or car, même si certains complexes sont disponibles commercialement, il est peut-être préférable (pour le coût et la qualité) ou même indispensable de pouvoir préparer ses propres complexes, d'autant plus que la préparation de tels complexes-or est souvent simple et peu onéreuse.

1. PRÉPARATION DE SUSPENSIONS D'OR COLLOÏDAL MONODISPERSÉ

Les suspensions d'or colloïdal monodispersé et de diamètre défini sont **préparées par la réduction contrôlée** d'une solution aqueuse d'acide tétrachloroaurique ($HAuCl_4$) par différents agents réducteurs (Tableau 1). Pour éviter toute interaction et déstabilisation de l'or, la verrerie doit être scrupuleusement lavée, rincée à l'eau bidistillée filtrée, avant d'être siliconée. Toutes les solutions sont préparées à partir de produits de haute pureté avec de l'eau bidistillée et filtrée sur membrane stérile de 0.22 µm. L'acide tétrachloroaurique ($HAuCl_4$) cristallisé (en ampoule de 1 g) étant très hydrophile, il est préférable de préparer une solution-mère à 1% dans l'eau bidistillée. Celle-ci peut être conservée plusieurs mois à 4°C.

Tableau 1

Préparation de suspensions d'or colloïdal de diamètre défini

Diamètre des particules d'or (nm)	Agent réducteur
2-3	Thiocyanate de Na
2-5	Sodium borohybride
3-5	Phosphore à saturation dans l'éther
5-12	Phosphore dans l'éther
6-10	Ultrasons (20 Kc, 125 W)
8-13	Acide ascorbique
3-17	Citrate de sodium et acide tannique
8-150	Citrate de sodium

1.1. MÉTHODE AU THIOCYANATE DE SODIUM OU DE POTASSIUM (NaSCN OU KSCN)

1. Déposer dans un erlenmeyer traité au silicone: 50 mL d'H_2O bidistillée contenant 0.5 mL de $HAuCl_4$ à 1% et 0.75 mL de K_2CO_3 0.2 M.

2. Ajouter sous agitation 0.3 mL de NaSCN (ou KSCN) 1 M. Laisser le mélange (jaunâtre) toute la nuit à l'obscurité, à la température de la pièce. Celui-ci vire au jaune-brun. Un séjour prolongé de plusieurs jours donne des particules d'or de taille supérieure (rouge-brun) qui peuvent être éliminées par centrifugation à 10 000 x *g* pendant 10 min.

1.2. MÉTHODE AU SODIUM BOROHYDRIDE

Pour des particules d'or colloïdal de 2 à 5 nm.

1. Mélanger 150 µL d'une solution aqueuse à 4% de $HAuCl_4$ et 200 µL de K_2CO_3 0.2 M, à 40 mL d'eau bidistillée refroidie à 4°C.

2. Ajouter rapidement plusieurs aliquotes, de 400 µL, d'une solution fraîche de sodium borohydride à 0.5 mg/mL au mélange maintenu sous agitation vigoureuse. Ajouter le sodium borohydride jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge-orangée. Maintenir l'agitation pendant 5 min supplémentaires.

1.3. RÉDUCTION PAR LE PHOSPHORE

Une solution saturée de phosphore blanc est préparée dans du diethyl éther à 100%. Le phosphore réagissant rapidement au contact de l'air, il faut d'abord découper les bâtons de phosphore en petits fragments sous l'eau, puis les sécher quelques secondes sur un papier filtre et ensuite les transférer rapidement dans le diethyl éther dans une fiole brune hermétiquement close. Laisser dissoudre sous légère agitation pendant au moins 2 h.

Des précautions doivent être prises pour la manipulation du phosphore, produit inflammable et explosif. Garder à portée de la main une solution de $CuSO_4$ à 1% pour neutraliser le phosphore si celui-ci s'enflammait.

1.3.1. Particules de 3 nm

1. Ajuster le pH d'une solution aqueuse de 100 mL d'$HAuCl_4$ à 0.01% à pH 7.2 avec du K_2CO_3 0.2 M. Chauffer jusqu'à ébullition.

2. Dès l'apparition de l'ébullition, ajouter 0.5 mL de la solution saturée de phosphore dans le diéthyl éther et mélanger. La réduction se signale par une couleur rouge-orangée.

1.3.2. Particules de 5 nm

1. Ajouter 3 mL de $HAuCl_4$ à 1% dans 240 mL d'eau bidistillée, puis ajuster à environ pH 9 avec 5.4 mL de K_2CO_3 0.2 N.

2. Ajouter rapidement 2 mL d'une dilution 1:4 de la solution de phosphore dans l'éther (en essayant de réduire le contact avec l'air).

3. Mélanger doucement pendant 15 min à la température de la pièce, puis chauffer pendant 20-30 min pour éliminer l'éther et développer la réduction de l'or. Refroidir à 4°C et utiliser cette solution dans les 14 jours.

1.4. MÉTHODE AUX ULTRASONS

1. Pour des particules d'or colloïdal de 6 à 10 nm, mélanger 0.1 mL de $HAuCl_4$ à 1% à 50 mL d'eau bidistillée, puis neutraliser le mélange avec du K_2CO_3 0.2 M.

2. Ajouter ensuite 0.5 mL d'alcool éthylique et traiter aux ultrasons (à 20 Kc et 125 W) avec une tige à bout plat.

1.5. RÉDUCTION PAR L'ACIDE ASCORBIQUE

1. Pour des particules d'or de 8 à 13 nm. Mélanger 1 mL de $HAuCl_4$ à 1% et 1.5 mL de K_2CO_3 0.2 M à 25 mL d'eau bidistillée à 4°C.

2. Ajouter sous agitation 1 mL d'une solution aqueuse à 0.7% d'acide ascorbique. La couleur vire au pourpre–rouge.

3. Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau bidistillée et chauffer jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge.

1.6. MÉTHODE À L'ACIDE TANNIQUE

Cette méthode permet de préparer des particules d'or entre 3 et 25 nm de diamètre selon la concentration d'acide tannique utilisée. On obtient des particules de 3 nm à la plus forte concentration d'acide tannique-(Galloylglucose) (Mallinckrodt, St-Louis).

Le K_2CO_3 sert à compenser l'effet acidifiant de l'acide tannique et maintient le pH entre 7.5 et 8. Il n'est pas nécessaire d'en ajouter lorsque le volume d'acide tannique est égal ou inférieur à 0.5 mL.

Solution A: 1 mL de $HAuCl_4$ à 1% dans 79 mL d'eau bidistillée.

Solution B: selon le diamètre des particules désirées.

Diamètre de l'or (nm)	3	6	8	10	15
Citrate trisodique à 1% (mL)	4	4	4	4	4
Acide tannique à 1% (mL)	5	1	0.5	0.1	0.01
K_2CO_3 25 mM (mL)	5	1	–	–	–
H_2O compléter à (mL)	20	20	20	20	20

1. Chauffer les solutions A et B sur une plaque chauffante à 60°C.

2. Ajouter sous agitation les 20 mL de la solution B à 80 mL de la solution A.

3. Chauffer ensuite la solution jusqu'à ébullition puis la refroidir et la conserver à 4°C.

4. Aux concentrations les plus élevées d'acide tannique, la réduction (couleur rouge vin) s'effectue en quelques secondes et le temps de réaction augmente graduellement à mesure que diminue la concentration d'acide tannique. En l'absence d'acide tannique, la réduction peut prendre jusqu'à 60 min à 60°C.

1.7. RÉDUCTION PAR LE CITRATE DE SODIUM

Dans cette méthode, le diamètre des particules d'or colloïdal sera inversement proportionnel à la concentration du citrate de sodium utilisée.

1.7.1. Particules d'or de 15 nm

1. Chauffer jusqu'à ébullition 100 mL d'une solution aqueuse à 0.01% de $HAuCl_4$.

2. Ajouter rapidement (d'un jet) 4 mL de citrate trisodique à 1% et maintenir l'ébullition. La réduction est complétée à l'apparition d'une couleur lie de vin. Refroidir.

1.7.2. Particules d'or de 40 nm

La méthode est identique, mais on ajoute seulement 2.8 mL de citrate de sodium 1%. Pour des diamètres supérieurs, il suffit de diminuer progressivement la concentration du citrate.

1.7.3. Particules d'or de 8 nm

Dans ce cas-ci, la méthode est inversée: l'or est ajouté au citrate.

1. Faire bouillir 115.5 mL d'eau ultrapure et y ajouter 7.5 mL de citrate trisodique à 1%; maintenir l'ébullition pendant encore 5 min.

2. Ajouter d'un jet 0.625 mL de $HAuCl_4$ à 2% et laisser bouillir jusqu'à la formation d'une couleur rouge lie de vin. Refroidir et conserver.

2. PRÉPARATION DE COMPLEXES MARQUÉS

L'or colloïdal est un colloïde hydrophobe constitué de particules métalliques chargées négativement (en suspension aqueuse elles se repoussent) qui peuvent lier des macromolécules par adsorption électrostatique. Il s'agit d'interactions relativement stables qui n'affectent en rien l'activité de la molécule marquée.

L'adsorption des protéines sur l'or colloïdal est influencée par le pH et la concentration des protéines, mais aussi par la force ionique des tampons ainsi que par le diamètre des particules d'or. Le couplage de protéines à des particules d'or de plus de 40 nm de diamètre donne généralement des rendements inférieurs et la stabilité aux électrolytes diminue. Pour des particules d'or colloïdal de diamètre donné, le nombre de sites de liaison pour différentes protéines est inversement proportionnel à la masse moléculaire de la protéine, mais directement proportionnel au diamètre des particules d'or. Les complexes sont de tailles élevées et leur pénétration à travers la membrane cytoplasmique sera limitée à des molécules couplées à des particules d'or de très petite taille (2 à 30 nm). Le pH optimal d'adsorption d'une protéine sur l'or est situé au niveau ou légèrement au-dessus de son pH isoélectrique (pHi).

2.1. DÉTERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE COUPLAGE

2.1.1. Détermination de la stabilité de l'or en fonction du pH

1. Préparer les tampons suivants à une concentration de 100 mM:

   - tampon citrate–phosphate pH 4 à 6.5

   - tampon phosphate pH 7 à 7.6

   - tampon Tris–HCl pH 8 à 9

   - tampon carbonate pH 9.5 à 11

2. Déposer 7 µL de chacun des tampons dans les puits d'une microplaque et ajouter à chaque puits 9.3 µL d'or. Incuber 5 min à la température de la pièce, un changement de couleur du rouge vers le violet ou le bleu pâle indique une déstabilisation de l'or. **Noter l'intervalle de pH où la couleur rouge est maintenue.**

2.1.2. Détermination des conditions optimales de pH

1. La macromolécule purifiée est diluée à raison de 5 à 10 mg/ mL dans de l'eau bidistillée.

2. Déposer dans les puits d'une microplaque 90 µL d'or à différents pH et ajouter 10 µL de protéine. Incuber 10 à 15 min à la température de la pièce. La stabilité du complexe protéine–or selon le pH est visualisée et considérée stable si la couleur reste rouge. Il est recommandé de travailler à un pH de 0.5 unité plus élevé que le pHi de la macromolécule.

2.1.3. Détermination de la concentration minimale de protéine pour stabiliser l'or colloïdal

1. Déposer 20 µL d'eau bidistillée dans une série de puits d'une microplaque ajouter 20 µL d'une solution de 500 ou 1000 µg/mL de protéine dans le premier puits, puis dans les puits suivants 20 µL des dilutions successives en volumes égaux de cette solution protéique.

2. Déposer 100 µL d'or tamponné au pH requis dans chacun des puits à l'exception du dernier. Les mélanges sont incubés 15 min à la température de la pièce.

3. Ajouter 20 µL d'une solution de NaCl à 10% dans chaque puits et laisser réagir pendant 5 min, visualiser et déterminer la concentration de protéines du dernier puits où la couleur rouge est maintenue. La dernière dilution qui stabilise 100 µL d'or correspond à la concentration minimale stabilisante de protéine par millilitre.

Dans la majorité des cas, une déstabilisation de l'or se signale par un virage de la couleur au bleu. Dans ce cas, les particules de 5 nm obtenues par la méthode à l'acide tannique qui visualise s'il y a déstabilisation, il faut ajouter 5 µL de peroxyde d'hydrogène à 30% par millilitre de la solution protéine–or. Pour les particules d'or produites par la méthode au thiocyanate, la déstabilisation donne un mélange légèrement voilé lorsqu'examiné en lumière diffuse, généralement la concentration minimale de protéine ainsi déterminée pour stabiliser l'or colloïdal est doublée ou augmentée de 10% lors du couplage.

2.2. MÉTHODES DE COUPLAGE DES MACROMOLÉCULES À L'OR COLLOÏDAL

2.2.1. Principe général

La protéine bien purifiée est dialysée contre de l'eau, une solution saline de NaCl 5 mM ou un tampon, tel que le tampon Borax–HCl 2 mM à pH 9 pour les immunoglobulines, avant d'être centrifugée ou filtrée (0.22 µm). Ces étapes préliminaires permettent d'éliminer les impuretés, les agrégats mais surtout les électrolytes qui pourraient interférer avec l'adsorption des macromolécules.

1. Le pH de l'or colloïdal est ajusté à 0.5 unité au-dessus du pHi de la protéine avec du K_2CO_3 0.2 M ou du HCl 0.1 N. Pour éviter de colmater l'électrode du pH-mètre il est conseillé de suivre la méthode suivante: ajouter 2 gouttes de polyéthylène glycol 20 000 (PEG 20M), en solution aqueuse à 1% à un aliquote de 5 mL d'or pour le stabiliser avant d'effectuer la lecture, ensuite déterminer le volume de K_2CO_3 ou HCl nécessaire pour ajuster le pH à la valeur requise.

2. Ajouter à l'or, la protéine à la concentration minimale stabilisante déterminée, majorée de 10%.

3. Après quelques minutes (2 à 3 min), ajouter 20 µL de PEG à 1% et centrifuger les complexes (protéines-or) à 12 000 x *g* pendant 5 min pour des particules d'or de 50 nm, à 40 000 x *g* ou 60 000 x *g* pendant 60 min pour des particules d'or de respectivement 12 nm et 5 nm.

4. L'or métallique, non couplé, forme un culot ferme qui n'est pas resuspendu. Le sédiment constitué par les complexes protéines-or est resuspendu dans un tampon iso-osmotique (100 mM) à un pH compatible avec l'activité biologique et avec la stabilité de l'or. Ajouter au tampon, un agent stabilisant (PEG 20M) ou albumine sérique bovine (type V), ainsi qu'un inhibiteur bactérien comme l'azoture de sodium à 0.02%.

5. Les complexes peuvent être filtrés sur membrane de 0.22 µm (s'assurer que le type de filtre n'adsorbe pas la protéine) ou purifiés par plusieurs cycles d'ultracentrifugation ou encore par centrifugation en gradient de saccharose (10 à 30%) ou de glycérol. Cette dernière méthode permet de récolter des complexes de taille uniforme et d'éliminer la protéine libre ou les agrégats d'or qui ont tendance à se former lors de la conjugaison. Les complexes peuvent aussi être concentrés dans un sac à dialyse sur un gel de silice et purifiés par chromatographie sur de petites colonnes de Sephacryl S–400. Les fractions actives ont alors moins tendance à agréger ou à agglutiner.

La mesure de la densité optique entre 510 et 550 nm donne un pic d'adsorption avec un maximum à 520 nm. Il est recommandé de suspendre ceux-ci à une concentration donnant une lecture de densité optique de 2.5–10 à 520 nm, pour standardiser les complexes protéine-or .

Le diamètre des particules d'or peut-être vérifié au microscope électronique. Des grilles recouvertes de formvar sont traitées 10 min sur une goutte de poly–L–lysine (masse moléculaire 70 000) à 0.01% à pH 7.4 avant d'être rincées à l'eau distillée puis séchées. Déposer sur la grille une goutte d'or colloïdal ou des complexes–or. Diluer ces derniers dans un tampon Tris–HCl 20 mM à pH 8.2 à une densité optique de

0.25, à 520 nm et incuber 10 min. Rincer de nouveau et prendre une série de micrographies calibrées à l'aide de cristaux de catalase en coloration négative.

Les complexes sont de préférence conservés à 4°C et restent stables pour des durées de plusieurs mois à un an, en présence d'un inhibiteur bactérien tel l'azoture de sodium à 0.02%. Il est possible de les congeler en présence de 50% de glycérol, ou à –70°C sous forme de microgouttes (25 µL) dans l'azote liquide.

2.2.2. Immunoglobulines-Or

La préparation de ce type de complexes s'avère délicate car même purifiées par chromatographie d'affinité, les immunoglobulines renferment une population hétérogène d'IgG avec des pHi différents. En revanche, plusieurs de ces immunoglobulines sont instables en solution à faible concentration ionique et auront tendance à s'agréger à pH neutre. Plusieurs protocoles ont été proposés et dépendent du type d'immunoglobuline à coupler.

L'adsorption des anticorps monoclonaux (AcM) est plus facile puisque leur pHi peut être mieux défini. Les AcM–Or constituent d'excellents réactifs en immunocytochimie directe.

2.2.2.1. Préparation des immunoglobulines pour l'adsorption

Les IgG de chèvre, de lapin et de souris (1 mg/mL) purifiées par chromatographie d'affinité, sont dialysées contre un tampon 2 mM Borax–HCl à pH 9 pendant 4 h, puis centrifugées, juste avant usage, à 100 000 x *g* pendant 1 h à 0°C.

2.2.2.2. Détermination de la concentration minimale stabilisante de protéine

La concentration minimale stabilisante de protéine est déterminée par le test de floculation au NaCl et le pH de la solution d'or est ajusté à pH 9 avec du K_2CO_3 0.2 N (voir section 2.1.3). Centrifuger l'or à 4800 x *g* pendant 20 min pour des particules de 5 nm ou à 250 g pendant 20 min pour des particules de 20 à 40 nm. Faire une série de dilutions linéaires de l'IgG dans des puits d'une microplaque selon le tableau suivant:

IgG diluée 1:3 ou 1:5 (µL)	25	20	15	10	5	2.5	0
Tampon borax pH 9 (µL)	75	80	85	90	95	97.5	100

Déposer dans chaque puits 500 µL d'or colloïdal à pH 9, agiter puis laisser reposer 2 min avant d'ajouter 100 µL de NaCl à 10% par puits. Après agitation, mesurer l'absorbance à 520 nm, ou évaluer visuellement. La dernière dilution bien rosée correspond à la concentration minimale d'immunoglobuline nécessaire pour saturer l'or colloïdal.

2.2.2.3. Préparation du complexe IgG–or

1. À la concentration minimale stabilisante d'immunoglobuline, majorée de 10%, mélanger un volume correspondant d'or à pH 9.

2. Après 2 min de contact, ajouter le volume requis d'une solution filtrée d'albumine sérique bovine (ASB) à 10% dans un tampon Borax-HCl à 2 mM pour atteindre une concentration finale de 1%.

3. Centrifuger le mélange à 60 000 x *g* pendant 1 h pour des particules d'or de 5 nm ou à 14 000 x *g* pour des particules de 20 à 40 nm. Aspirer délicatement le surnageant, recueillir le culot mobile et le suspendre dans 10 mL de tampon Tris–HCl 20 mM à pH 8.2 contenant 1% d'ASB.

4. Après une nuit de repos à 4°C, centrifuger de nouveau. Le complexe IgG–or est alors recueilli dans le même tampon Tris–HCl-ASB additionné d'azoture de sodium à 0.02%. Le complexe peut être filtré sur une membrane de 0.22 µm.

5. La dilution est standardisée pour qu'une dilution 1:20 du complexe donne une absorbance à 520 nm de 0.5, 0.35 ou 0.25 pour de l'or respectivement de 40 nm, 20 nm ou 5 nm de diamètre, le tampon Tris–HCl–ASB servant de témoin.

Ces complexes-or ont souvent tendance à former des agrégats ou des agglutinats dûs à une déstabilisation causée par l'addition du tampon Tris-HCl et les rendements sont parfois décevants. Avant usage, on recommande d'effectuer une centrifugation à faible vitesse, à 4 800 x *g* pendant 20 min pour l'or à 5 nm et à 250 x g pendant 20 min pour l'or de 20 à 40 nm de diamètre. Cette opération vise à éliminer ces agrégats qui peuvent donner un bruit de fond élevé lors de l'immunomarquage.

2.2.2.4. Anticorps monoclonaux–or

Pour les anticorps monoclonaux, le pH optimal d'adsorption des protéines est déterminé de préférence par électrofocalisation sur gel de polyacrylamide ou d'agarose. Le pH de l'or est alors ajusté au pHi de l'AcM avec du H_3PO_4 à 0.2 M ou du K_2CO_3 à 0.2 M. Par la suite, suivre la méthode décrite pour les anticorps hétérogènes en effectuant le changement suivant. Avant l'addition du ASB à 10% au mélange, s'assurer que le pH est bien à 9, sinon l'ajuster avec du NaOH 0.5 M.

2.2.3. Protéine A-or

La protéine A, extraite de la paroi de *Staphylococcus aureus*, se lie spécifiquement au fragment Fc des immunoglobulines G de plusieurs espèces animales. Elle présente une forte affinité avec les IgG humaines, les IgG de lapin, de cobaye, de cochon ou de chien. Cette affinité est plus variable avec les IgG de boeuf, de cheval ou de souris, mais faible avec les IgG de rat, de mouton ou de chèvre. La protéine A présente aussi une certaine affinité avec les IgA, IgM et IgE mais pas avec les IgD (Goodswaard *et al.* 1978). La protéine A, a une masse moléculaire de 42 000, un pHi de 5.1 et ne présente plus que deux des quatre sites de réaction mis en évidence dans la paroi de la bactérie. La liaison protéine A–IgG est forte et rapide, et l'équilibre est atteint en 30 min à des températures de 4°C à 37°C, la majorité se liant dès les premières minutes.

Le complexe protéine A–or, beaucoup plus stable, constitue une excellente alternative aux IgG–or, dans la mesure où l'affinité de la protéine A pour les IgG utilisées est effective.

L'adsorption de la protéine A à l'or colloïdal s'effectue à pH entre 5.5 et 6.

1. Des concentrations de 60, 50 ou 30 µg de protéine A dissoute dans 0.2 mL d'eau sont nécessaires à la stabilisation de 10 mL d'or d'un diamètre respectif de 3 nm, 7 à 10 nm ou 15 nm. *Il est préférable d'ajouter l'or à la protéine*, et non l'inverse, pour éviter la formation d'agrégats.

2. Centrifuger le mélange 1 h à 4°C à 12 000 x *g*, 40 000 x *g* ou 60 000 x *g*, selon le diamètre de l'or. Resuspendre le culot dans 1.5 mL de saline phosphatée 100 mM pH 7.3 contenant 0.02% PEG 20M et 0.02% d'azoture de sodium. Le complexe protéine A–or ainsi obtenu est stable plusieurs mois à 4°C .

2.2.4. Protéine–G–or

Une nouvelle alternative, encore plus intéressante que la protéine A, est la protéine G isolée à partir de la paroi d'une souche de *Streptococcus* humain (G–148) ou encore obtenue par recombinaison génétique. En effet la protéine G est possède une plus grande avidité et affinité que la protéine A pour les IgG, y compris pour les IgG de souris, de rat ou de chèvre. Nous avons réalisé récemment le couplage de la protéine G à l'or.

1. Ajouter, sous agitation, à 0.25 mg de protéine G dissoute dans 100 µL d'eau distillée, 10 mL d'or colloïdal à pH 5.

2. Centrifuger à 12 000 x *g* pendant 30 min

3. Resuspendre le sédiment rouge sombre dans 1 mL de tampon phosphate à 100 mM, pH 7.2 contenant 0.2 mg/mL de PEG 20M.

2.2.5. Enzymes-or

En se fondant sur les principes de base des techniques d'or, on a développé une méthode pour la localisation sur coupe ultrafine d'un substrat, par son enzyme correspondante couplée à des particules d'or. Les conditions optimales de couplage sont déterminées par les tests préliminaires décrits dans la section 2.1, en tenant compte des propriétés des enzymes dont leur activité à des intervalles de pH restreints, et leur sensibilité aux températures. Les complexes enzyme–or ont une durée de vie à 4°C qui ne dépasse pas 10 jours en général. Nous citerons deux de ces méthodes qui présentent un intérêt pour l'identification sur coupe des acides nucléiques viraux, soit l'ARNase–or et l'ADNase–or.

ARNase-or

1. Dissoudre 0.1 à 0.5 mg d'ARNase dans 0.2 mL d'eau et ajouter à 10 mL d'or de 15 nm à pH 9 (pH de liaison).

2. Après centrifugation à 25 000 *g* pendant 30 min à 4°C, le sédiment est resuspendu dans du tampon PBS-PEG pH 7.3 (pH de l'activité enzymatique).

ADNase-or

1. Dissoudre 0.1 à 0.5 mg d'ADNase–I dans 0.2 mL d'eau et les ajouter à 10 mL d'or de 15 nm à pH 6.

2. Après centrifugation, le sédiment est resuspendu dans du tampon PBS-PEG pH 6.

2.2.6. Lectine-or

Les lectines sont utilisées pour l'identification et la localisation de groupements d'hydrates de carbone spécifiques. Certaines applications ont été faites en virologie pour différencier les sous-types de certains virus enveloppés ou pour étudier le transport des glycoprotéines virales. Le mode de couplage est identique à celui qui a été décrit précédemment, tout en respectant les conditions de couplage (pH et concentration) de chaque lectine.

2.2.7. Streptavidine–or

Le système biotine-avidine offre plusieurs avantages dont une forte affinité, et des complexes très stables. L'avidine isolée du blanc d'oeuf a un pHi de 10, ce qui rend difficile sa conjugaison à l'or. Par contre, la streptavidine extraite de *Streptomyces avidini* avec un pHi de 6.4 permet une meilleure conjugaison.

1. À 20 mL d'or ajusté à pH 7.4 avec 200 µL de $NaHCO_3$ 1 M, ajouter d'abord 0.5 mL d'une solution de streptavidine à 1 mg/mL dans du tampon PBS 1 mM pH 7.4, puis 200 µL de PEG 6 000 à 2%.

2. Centrifuger 30 min à 10 000 rpm (particules d'or de 2 à 5 nm) ou à 3 000 rpm (10 nm).

3. Placer le surnageant sur un coussin de saccharose à 37.5% dans un tampon PBS 1 mM contenant 0.02% PEG et centrifuger 30 min à 40 000 rpm (2 à 5 nm) ou 10 000 rpm pour (10 nm) dans un rotor SW40 de Beckman.

4. Suspendre le culot dans du PBS 0.1 M pH 7.4 contenant 0.02% de PEG et 0.05% d'azoture de sodium.

La streptavidine-or se fixe spécifiquement à la biotine et peut être utilisée aussi bien avec des IgG–biotinylées, des lectines-biotinylées ou des sondes d'ADNc biotinylées pour la localisation des macromolécules correspondantes.

Conditions de couplage de quelques lectines à 10 mL d'or

Lectines	Spécificité	pH	µg
Ricinus communis-I	ß-D-Gal	8.0	130
Ricinus communis-II	ß-D-Gal, Gal NAc	8.0	130
Arachide	ß-D GAL	6.3	130
Helix pomatia	α-D-GalNAc	7.4	65
Soya	α-D-GalNAc, ß-D-GalNAc	6.1	65
Lens culinaris	α-D-Man, a-D-Glc, a-L-Fuc	6.9	130
Lotus tetragonolobus	α-L-Fuc	6.3	130
Ulex europeus lectine I	α-L-Fuc	6.3	250
Agglutinine de germe de blé (WGA)	ß-D-GlcNac	7.0	—
Concanavaline A	α-D-Man, α-D-Glc	8.0	250
Bandeireae simplicifolia isolectine-B4	α-D-Gal, α-D-GalNAc	6.2	250
Peroxydase	Concanavaline	8.0	65

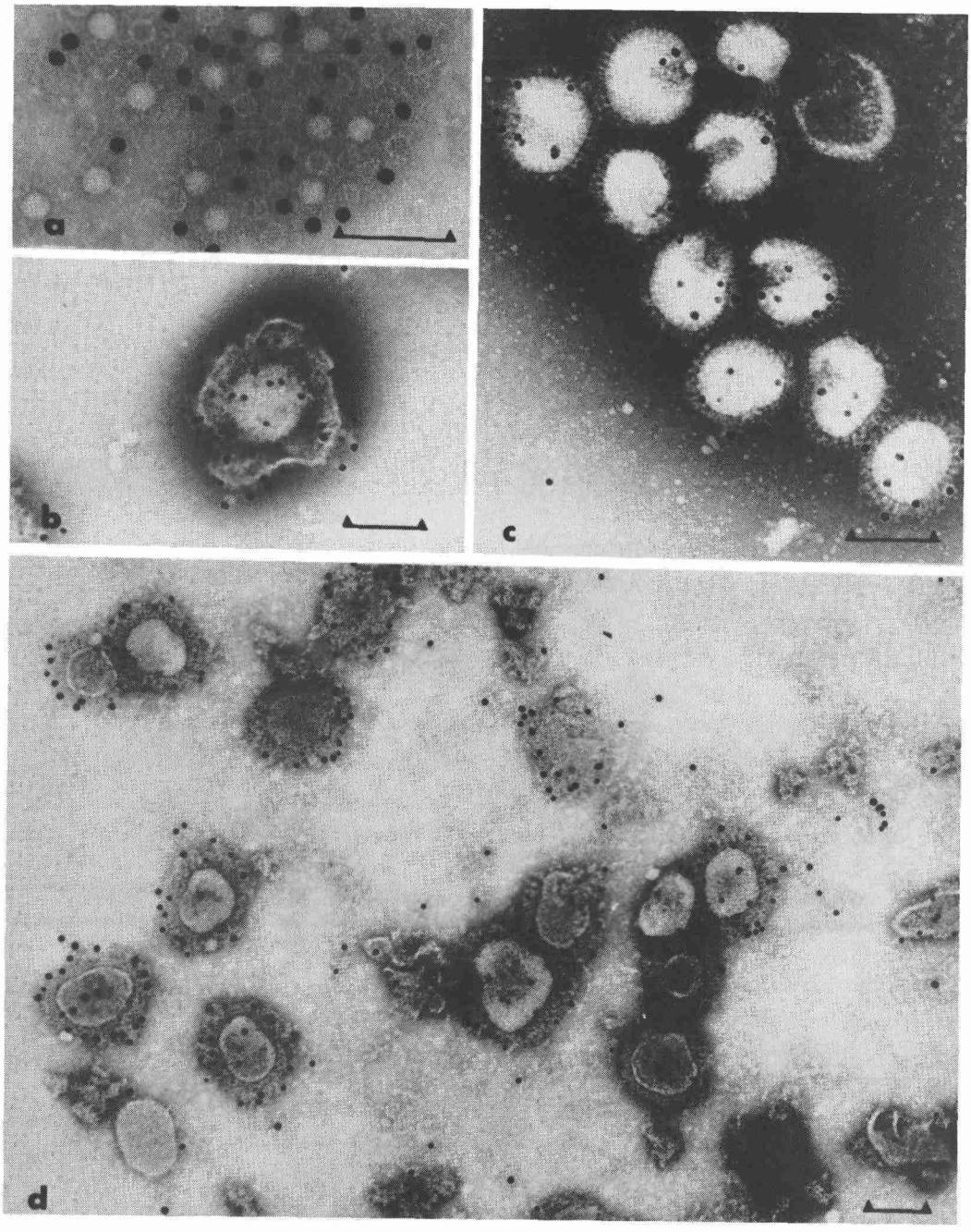


Figure 1

Identification de particules virales par immuno-marquage à l'aide de sérum polyclonal homologue et de la protéine A-or en coloration négative

Virus de la densonucléose (a), virus *Herpes simplex* type I (b), virus influenza type B (c) et coronavirus de dinde (d) (Echelle = 0.1 µm).

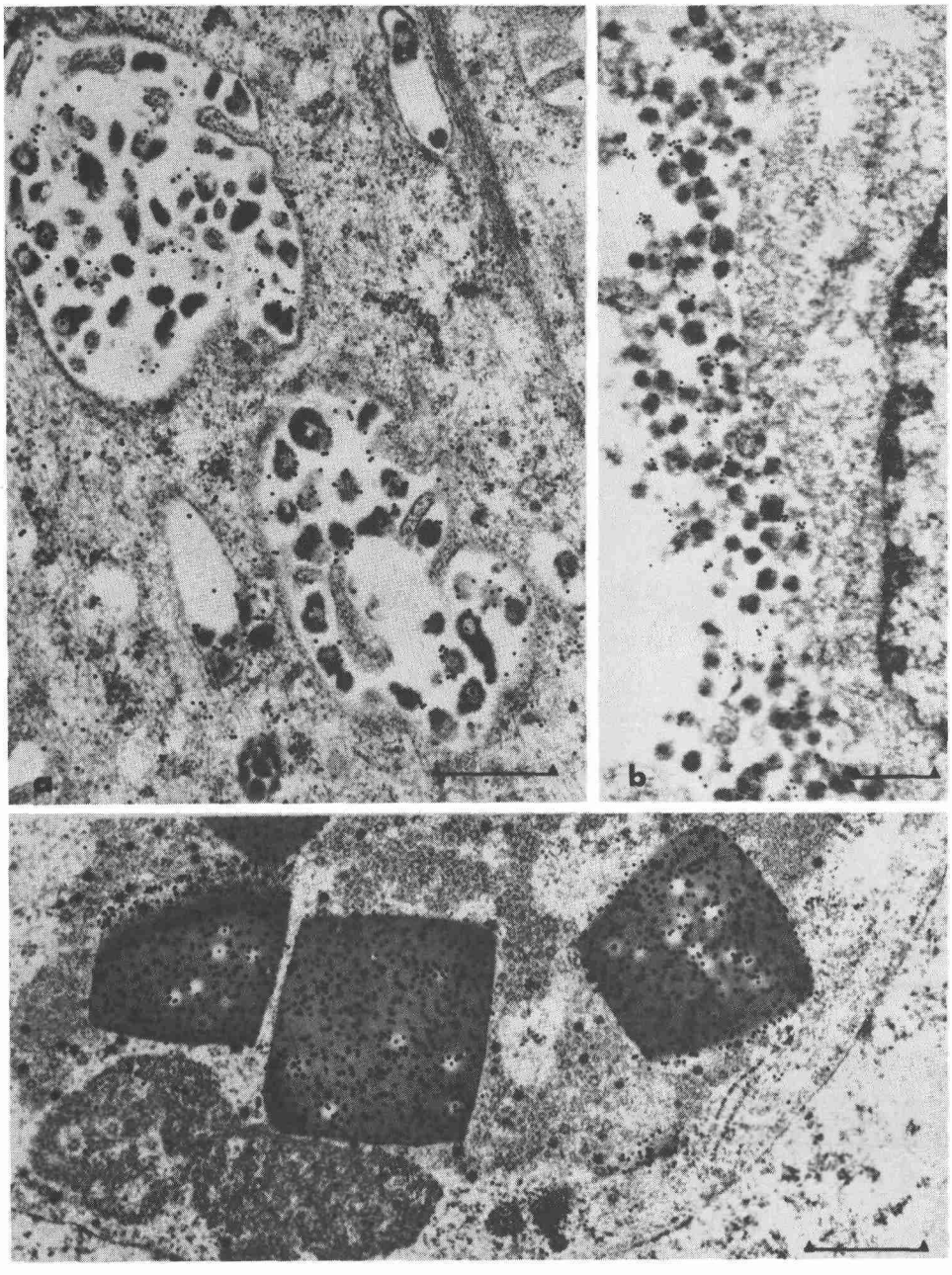


Figure 2

Localisation d'antigènes viraux sur coupes ultrafines

Virus herpès bovin IBR sur cellules MDBK localisé avec un sérum polyclonal bovin et la protéine A-or (a). Virus de l'immunodéficience humaine (HIV) sur cellules H9 localisé par un sérum monoclonal anti-p24 une protéine de la capside et un anti-IgG de souris couplé à l'or (b). Virus de la polyédrose cytoplasmique sur cellules de *Lymantria dispar*: localisation de la polyédrine par un sérum polyclonal de lapin anti-polyèdre et de la protéine A-or (c). Fixation à la glutaraldéhyde 1% et enrobage à l'Araldite 502 (Échelle = 0.5 µm).

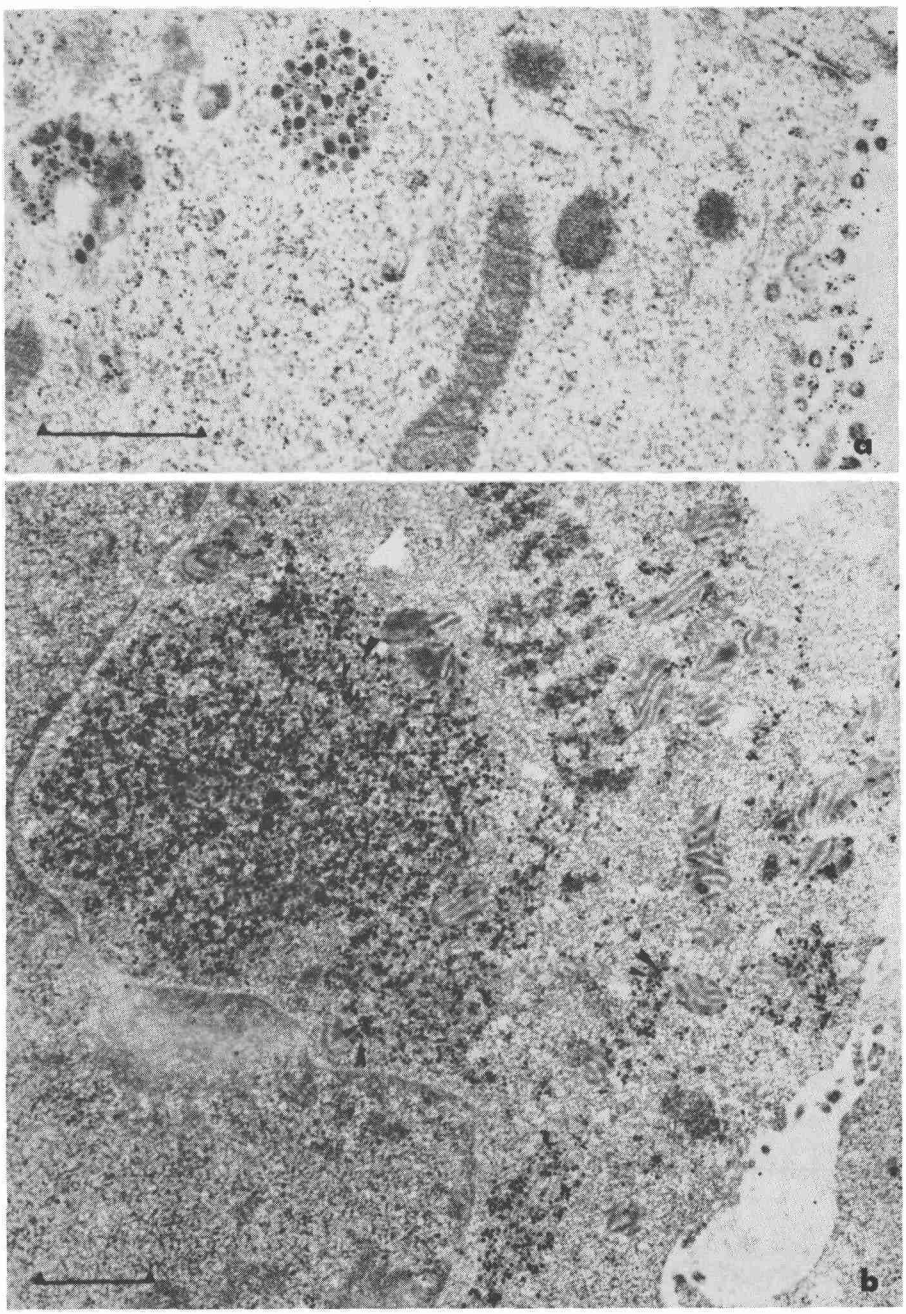


Figure 3

Localisation d'antigènes viraux sur coupes ultrafines

Coronavirus de dinde sur cellules HRT-18 localisés par un sérum polyclonal de lapin et la protéine A-or (a). Virus de la stomatite vésiculeuse sur cellules Vero (b): localisation double en utilisant successivement sur chacune des faces de la coupe des sérums polyclonaux de lapin anti-N (flèche grasse) et anti-S (flèche mince) et la protéine A-Or de 15 et 8 nm respectivement. Fixation au glutaraldéhyde 1% et enrobage à l'Araldite 502 (Échelle = 0.5 µm).

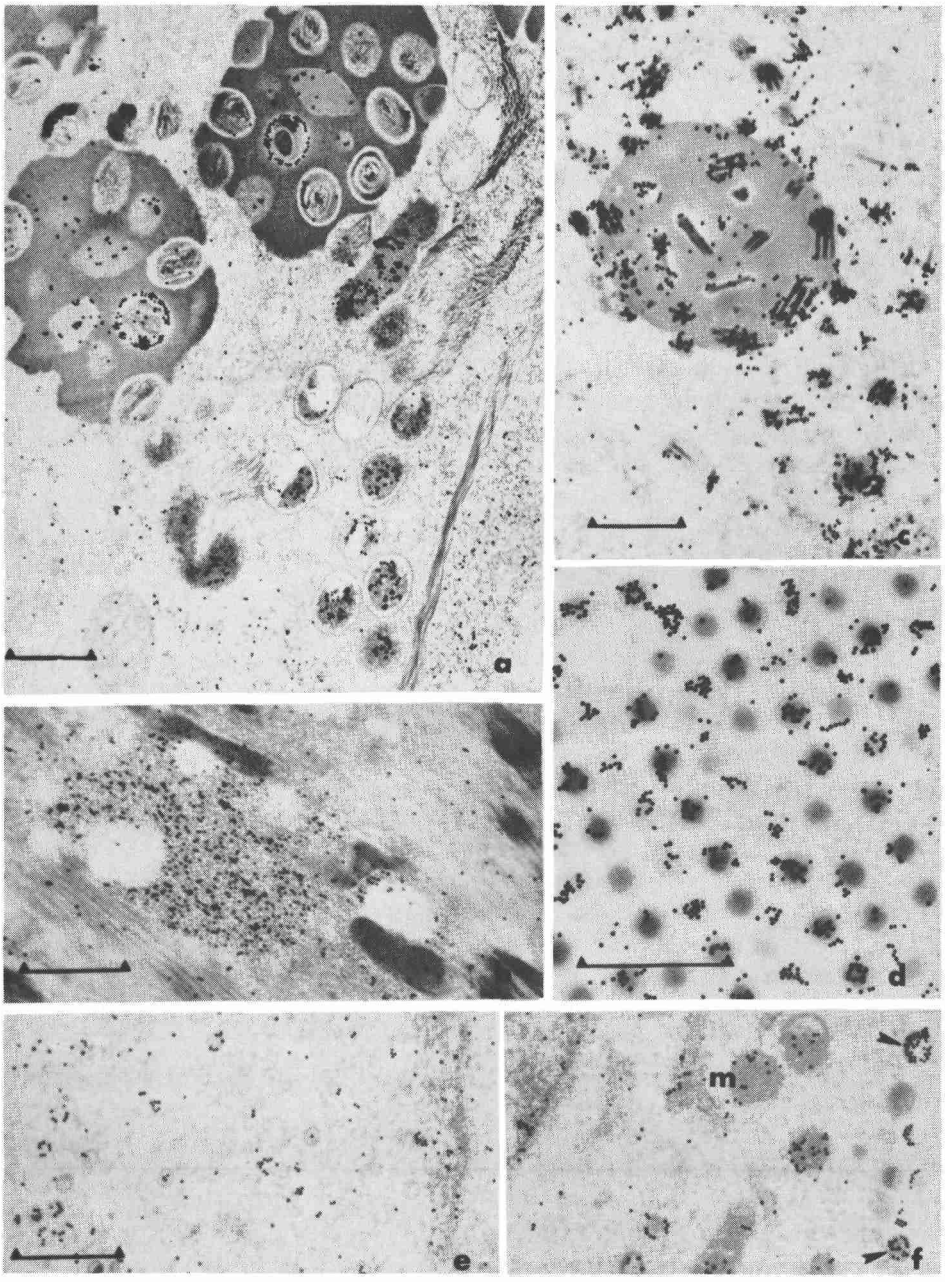


Figure 4

Localisation et caractérisation des acides nucléiques par la technique enzyme-or

Localisation de l'ARN du virus entomopox de *Christoneura fumiferana* démontrant la présence d'ARN chez ce virus à ADN (a) et du virus Nodamura de *Galleria mellonella* (b) avec l'ARNase-or. Localisation avec de l'ADNase-Or de l'ADN du virus de la polyédrose nucléaire (VPN) (a), du virus irisant de *Tipula* (TIV) chez *Galleria mellonella* (d) et du virus *Herpes simplex* type I sur cellules HeLa (e: capsides intranucléaires; f: virions bourgeonnants). L'hétérochromatine et les mitochondries (m) sont aussi marquées lors de cette technique. Fixation au glutaraldéhyde 1% et enrobage à l'Araldite 502 (Échelle = 0.5 µm).

3. APPLICATION À LA LOCALISATION DES PROTÉINES ET DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX

La réalisation et le succès du marquage avec les complexes-or, en dehors de la qualité des complexes, vont dépendre principalement: (i) de la préservation de la structure cellulaire et de l'immobilisation, de la rétention et de la préservation de l'activité biologique de la macromolécule cible et selon le choix de la méthode de fixation et de déshydratation: (ii) de l'accessibilité de la macromolécule cible et des interactions électrostatiques qui sont fonction du choix de la méthode d'enrobage.

Généralement, ces exigences tendent à s'exclure mutuellement et des compromis devront être faits selon la macromolécule étudiée. Différentes approches sont disponibles aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique. Certaines méthodes comme l'ultracryotomie, le cryodécapage, la cryofracture ou la microscopie à balayage requièrent une expertise et un équipement qui font souvent défaut. Cependant, les méthodes conventionnelles avec certaines modifications permettent d'obtenir des résultats très satisfaisants.

En méthode directe, les séquences de marquage comprennent une incubation avec le complexe-or suivie de rinçages, alors qu'en méthodes indirectes, une première incubation avec l'anticorps primaire sera suivie de l'incubation avec l'anticorps secondaire-or. Les rinçages et les dilutions des complexes-or ou des anticorps primaires sont généralement effectués dans un tampon phosphate 100 mM pH 7.2–7.4, contenant 0.15 M de NaCl (PBS) ou, pour des pH près de 8, dans du tampon Tris–HCl 20 mM contenant 0.15 M de NaCl (TBS). Dans la méthode d'immuno–or, on ajoute au tampon, de l'albumine sérique bovine (1%), de l'ovalbumine (1%), du sérum normal (1 à 5%, décomplémenté par chauffage 30 min à 56°C) provenant de l'espèce animale qui fournit l'anticorps secondaire couplé à l'or , du Tween 20 (0.05%), du Triton X–100 (0.1%) ou de la gélatine (3%). Ces additifs servent d'agents bloquants des groupements libres non spécifiques et/ou d'agents mouillants. L'addition d'azoture de sodium (NaN_3) à des concentrations de 0.2 à 0.02% permet de limiter l'internalisation des complexes-or en méthode de préenrobage, et d'empêcher la contamination bactérienne. Aucun de ces additifs n'est recommandé lors de l'utilisation des enzymes–or ou des lectines–or. De plus, dans ces systèmes, le pH du tampon doit être ajusté au pH d'activité de chaque macromolécule. Finalement les conditions de dilution doivent être déterminées pour chaque protéine testée de manière à limiter le bruit de fond tout en maintenant un marquage spécifique intense.

Des témoins doivent démontrer, la spécificité des réactifs utilisés et, l'absence d'adsorption non spécifique de ces réactifs. Des concentrations élevées de réactifs et la présence de certains additifs peuvent contribuer à une telle adsorption non spécifique. Les détergents non ioniques, tel que le Tween 20 couramment utilisé pour rendre les coupes hydrophiles, réduisent efficacement le bruit de fond, à condition cependant que les coupes soient déposées sur des grilles nues de nickel. La présence d'un film support entraîne, en présence de Tween, une adsorption non spécifique très élevée. Les détergents cationiques ou anioniques et la présence d'impuretés dans certains lots d'albumine sérique bovine, qui modifie les charges électrostatiques ou neutralise les sites réactionnels, provoquent un marquage non spécifique. Avec les anticorps

monoclonaux, il est préférable d'utiliser de l'albumine sérique bovine ou de l'ovalbumine plutôt que le Tween qui modifie les charges de plusieurs anticorps monoclonaux.

3.1. APPLICATION DE L'OR COLLOÏDAL AUX MÉTHODES D'IMMUNO-EMPREINTE

L'utilisation de l'immuno-dot et l'immuno-empreinte en combinaison avec l'or colloïdal comme marqueur apparaît être une méthode très sensible pour la détection de complexes antigène-anticorps. Ces méthodes permettent de détecter et d'identifier des antigènes viraux immobilisés sur papier de nitrocellulose ou encore de caractériser des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre les protéines virales.

1. Une fois les filtres de nitrocellulose imprégnés des différentes dilutions de l'antigène, ou après le transfert sur une bande de nitrocellulose des protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cuire ces filtres pendant 1 h à 80°C dans un four sous vide pour stabiliser l'imprégnation.

2. Plonger les filtres dans du PBS contenant 5% de sérum normal (de l'espèce animale chez laquelle est produit l'anticorps secondaire) ou 0.5% d'ASB et 0.05% de Tween 20, de façon à bloquer les liaisons non spécifiques.

3. Après 30 min, les incuber toute la nuit à 4°C ou 1 h à la température de la pièce avec l'antisérum ou l'AcM dilué dans le PBS-Tween puis rincer 4 fois 5 min au PBS-Tween.

4. Plonger les filtres pendant 1 h dans l'anti–IgG–or ou la protéine A-or dilué dans le même tampon. Après un dernier rinçage au PBS, on effectue la lecture. La réaction positive se reconnaît par une tache rose. Cette réaction positive peut être intensifiée avec un révélateur à l'argent (voir section 3.2.1).

3.2. APPLICATION DE L'OR COLLOÏDAL EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Les complexes-or peuvent être appliqués directement sur des coupes à la paraffine ou sur coupes semi-fines de résine. L'or présente, une couleur rouge en lumière transmise et, en concentration suffisante, il est visualisé directement au microscope optique. À concentration submicroscopique, les traces invisibles d'or peuvent être intensifiées par une réaction photochimique à l'argent ou par des procédés photographiques.

Le traitement des coupes, préalablement au marquage, par des enzymes protéolytiques (protéase VII, trypsine ou pepsine) peut parfois permettre une intensification du marquage, en augmentant l'accessibilité des protéines aux complexes ou en libérant l'activité biologique des protéines cibles. Une autre façon d'intensifier le marquage serait d'augmenter le nombre d'étapes intermédiaires (méthode du sandwich) soit Ac primaire-Ac secondaire-Protéine A-or ou Ac tertiaire-or, ou Ac primaire-Ac secondaire biotinylé-Streptavidine-or, ou encore Ac primaire biotinylé-anti-biotine-Protéine A-or.

Finalement, la couleur caractéristique obtenue par cette méthode jumelée avec d'autres méthodes immunocytochimiques permettent la localisation simultanée de plusieurs protéines ou groupements hydrates de carbone dans une même cellule ou un même tissu.

3.2.1. Marquage des cellules avant fixation

Avant la fixation, incuber les cellules avec l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène de surface et ensuite avec l'anticorps secondaire couplé à l'or. Ce marquage s'effectue stérilement avec des cellules en suspension ou encore avec des cellules adsorbées sur lames de microscope recouvertes d'un film de poly-L–lysine de masse moléculaire entre 150 000 et 300 000. L'adhérence des cellules sur film, de poly–L–lysine évite les cycles de centrifugation répétés, et n'affecte pas le marquage. Si une intensification à l'argent est nécessaire, on doit éviter la poly–L–lysine qui peut entraîner la formation de précipités.

1. Rincer les cellules avec la solution tampon PBS-ASB-Sérum normal 5% $-NaN_3$ pH 7.2.

2. Incuber pendant 30 min à la température de la pièce 25 µL de cellules **(minimum 10^6 cellules) et 25 µL de la dilution de l'anticorps primaire.**

3. Rincer 3 fois avec le tampon PBS-ASB-NaN_3 par des cycles répétés de centrifugation et de resuspension.

4. Ajouter 25 µL de protéine A–or diluée dans le PBS-ASB-NaN_3 ou d'anticorps secondaires-or dilué dans du TBS-ASB-NaN_3 pH 8.2 et incuber 60 min à la température de la pièce.

5. Rincer 3 fois 5 min, au PBS-ASB ou TBS-ASB. Fixer les cellules pendant 2 min avec du formaldéhyde à 4% dans de l'alcool absolu, les rincer à l'eau distillée et les transférer dans du tampon citrate 0.01 M pH 4.

6. Intensifier à l'argent ou avec une émulsion photographique (NTB–2 de Kodak).

Pour une intensification à l'argent le réactif est le suivant: tampon citrate 85 mL, pH 3.5, 0.85 g d'hydroquinone. Immédiatement avant usage, ajouter 15 mL d'une solution fraîchement préparée de lactate d'argent ou de nitrate d'argent (0.11 g/ 15 mL). Protéger le mélange de la lumière. La réaction s'effectue dans le noir (ou sous un éclairage rouge) avec le réactif à l'argent, pendant 2 à 6 min.

Une autre solution consiste à recouvrir les cellules, fixées sur une lame de verre, d'une émulsion photographique liquide (NTB–2 de Kodak), puis de refroidir les lames à 0°C sur de la glace pendant 10 min. Rincer les cellules à l'eau courante, puis les déshydrater et les monter entre lame et lamelle.

3.2.2. Localisation sur coupes

Les coupes, exception faite des coupes à congélation ou des coupes de tissus enrobées au Lowicryl, qui sont colorées directement, doivent subir un prétraitement pour retirer le milieu d'enrobage.

1. Déparaffiner les coupes histologiques au xylène et les réhydrater graduellement à l'alcool jusqu'à l'eau; puis, les transférer dans un tampon approprié avant le marquage. Pour les coupes semi-fines de spécimens enrobés dans les résines Epon ou Araldite, les traiter de 2 à 5 min avec un mélange fraîchement préparé et filtré, composé de 2 g de NaOH, de 10 mL de méthanol absolu et de 5 mL de propylène oxyde.

2. Rincer ensuite les coupes dans du PBS-méthanol (1:1) puis au PBS. Rincer les coupes au PBS-ASB 0.1%-Tween 0.05% et Triton 0.1%, (deux bains de 5 min). Incuber avec du sérum normal pendant 10 min.

3. Drainer l'excès et incuber avec une dilution appropriée de l'anticorps primaire pendant 90 min. Utiliser le tampon PBS-ASB-Tween-Triton pour la dilution.

4. Rincer 3 fois 5-10 min avec le même tampon, avant d'incuber les coupes pendant 1 h en présence de l'anticorps secondaire-or ou de la protéine A-or dilué dans le PBS-ASB à une densité optique de 1.85 à 525 nm.

5. Rincer 3 fois au tampon. puis plusieurs fois à l'eau distillée.

6. Intensifier à l'argent (section 3.2.1) ou déshydrater rapidement les coupes et les monter entre lame et lamelle, avec ou sans coloration. Les structures marquées apparaissent rouge clair ou rouge foncé selon la densité du marquage et après intensification elles apparaissent brun-noir.

3.3. COLORATION DE DÉCORATION IMMUNONÉGATIVE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

La détection et l'identification de virus par coloration négative ou par immuno-électro-microscopie à partir d'extraits de plantes, de spécimens cliniques ou de surnageants de culture, présentent des difficultés dues à la présence de matériel contaminant non viral. Dans certains cas, le virus perd son intégrité structurale. Les méthodes de décoration à l'or favorisent la détection des virus peu identifiables.

Ces méthodes de décoration immunonégative permettent:

- d'identifier et de typer les virus animaux ou les virus de plantes
- de localiser et de visualiser la distribution et l'organisation des protéines virales de surface
- de caractériser les anticorps et particulièrement les Ac monoclonaux dirigés contre des épitopes des protéines de surface

3.3.1. Immunomarquage des virus directement sur grille

Le virus est adsorbé sur une grille recouverte d'un film de parlodion ou de formvar-carbone laquelle est soumise aux étapes successives de marquage décrites précédemment, et de coloration à l'acide phosphotungstique à 2%, pH 6.5 ou à l'acétate d'uranyle à 2%. Cette méthode exige un titre assez élevé de virus. Voir l'exemple à la Figure 1.

On propose comme variante de faire adsorber au préalable, sur la surface du film support de la grille, un anticorps spécifique au virus mais produit chez une autre espèce animale que celle qui fournit l'anticorps secondaire utilisé dans la méthode d'immunomarquage. Cette variante permet de capter spécifiquement les virus sur la grille et augmente l'efficacité de captage, surtout pour l'examen d'échantillons à faible concentration de virus. Le bruit de fond peut être diminué en ajoutant dans les solutions de dilution et de rinçage du ASB à 1%, de la gélatine à 3% ou du Tween 20 à 0.05%, si le virus est non enveloppé. Une préfixation légère au paraformaldehyde-glutaraldéhyde peut être nécessaire à la préservation de la structure de certains virus.

3.3.1.1. Exemple: Immunomarquage du virus influenza B humain

1. Faire flotter la grille recouverte d'un film support formvar ou collodion-carbone déionisé sur une goutte de **sérum de lapin** anti-influenza B humain dilué (déterminer la dilution optimale) ou dans du tampon PBS pendant 20 min à la température de la pièce.

2. Transférer pour quelques minutes la grille sur une goutte de la suspension du virus Influenza B (surnageant de milieu de culture ou expectorat) déposée sur une plaque d'agar à 2%.

3. Rincer sur 2 gouttes de tampon PBS-ASB à 1% ou de gélatine à 3%.

4. Transférer sur le **sérum humain** anti-influenza B dilué (à déterminer expérimentalement la dilution pour chaque sérum de référence) dans le PBS-ASB ou PBS-gélatine pendant **3 min. Des temps prolongés d'incubation n'améliorent pas l'intensité du** marquage mais, peuvent par contre augmenter le bruit de fond.

5. Rincer rapidement sur 6 gouttes de PBS-ASB ou gélatine.

6. Faire flotter la grille sur 1 goutte de sérum de chèvre anti–IgG-humain couplé à l'or ou de protéine A-or dilué dans le même tampon.

7. Rincer sur 6 gouttes de PBS puis sur 2 gouttes d'eau bidistillée et colorer au phosphotungstate ou à l'acétate d'uranyle.

Lorsque la protéine A-or est utilisée, il est possible, après l'incubation avec l'anticorps primaire, de traiter la grille pendant 60 min sur un mélange de sérum humain anti Influenza B et de protéine A–or (aux dilutions optimales à déterminer) incubé au préalable 30 min à 37°C. L'utilisation d'anticorps monoclonaux directement couplés à l'or pourrait abréger ces étapes.

Certains préfèrent une coloration à l'acétate d'uranyle dans l'alcool qui colore principalement les ribonucléoprotéines et contraste peu la structure du virus. Elle donne une meilleure résolution avec un bruit de fond faible. Cette méthode a permis de démontrer la répartition uniforme des hémagglutinines (HA) et la répartition en groupes des neuraminidases (NA) sur l'enveloppe du virus influenza, et une répartition uniforme des hémagglutinines-neuraminidases (HN) et des protéines de fusion (F) sur l'enveloppe du virus Sendai. Pour ce virus une préfixation s'avère nécessaire. Pour la coloration à l'acétate d'uranyle alcoolique, plonger la grille dans de l'alcool 50% pendant 10 sec, puis la transférer 30 sec dans un mélange (1:3) d'acétate d'uranyle 2%, et d'alcool éthylique 100%, ensuite la rincer à l'alcool à 95% et sécher.

Cette méthode de décoration a permis la localisation et la distribution des protéines NS et L du virus de la stomatite vésiculeuse, directement sur les complexes ribonucléoprotéines (RNP) isolés. Les RNPs, diluées dans un tampon HEPES 20 mM pH 7.4 contenant 2 mM d'EDTA pour empêcher le surenroulement des RNPs, sont adsorbées directement sur grille collodion-carbone pendant 15 min avant d'être soumis à l'immunomarquage.

3.3.1.2. Exemple: Immunomarquage de cellules cultivées directement sur grille

Cette méthode permet l'étude des relations des virus avec le cytosquelette ainsi que l'analyse structurale et l'identification des virus, et cela sans étape préalable de

purification ou de concentration qui peuvent altérer la morphologie virale. Les virus produits et libérés par les cellules infectées, cultivées directement sur des grilles parlodion-carbone, adhèrent à la surface du film support des grilles et peuvent être colorés au KPT ou décorés avec les méthodes à l'or.

Préparation des grilles en or recouvertes d'un film parlodion-carbone

Les grilles en or de 200 mesh sont lavées au HNO_3, à l'acétone puis à l'eau distillée. Elles sont recouvertes de parlodion et de carbone puis irradiées aux UV (360 nm) pendant 10 min. Elles sont rendues hydrophiles par un traitement au Nonidet P–40 à 0.1% dans du PBS pH 7.4 ou du milieu de culture, puis rincées plusieurs fois au tampon phosphate ou au milieu de culture. Il ne faut pas assécher les grilles, ni après le rinçage, ni lors du transfert de celles-ci dans le Petri de culture stérile où les cellules sont mises en culture.

Immunomarquage

Lorsque l'infection est assez avancée, les grilles sont récupérées, rincées dans du PBS stérile et fixées légèrement au glutaraldéhyde à 0.05% ou 0.1% pendant 3 min avant d'être soumises à la séquence de l'immunomarquage. Les grilles peuvent être post-fixées au glutaraldéhyde et à l'osmium avant la coloration au KPT ou encore avant un traitement par la méthode du point critique.

3.3.2. Immunomarquage des virus en suspension

La méthode d'immunomarquage en suspension donne un faible bruit de fond, tout en augmentant la sensibilité de la détection de l'antigène et est décrite comme la méthode la plus sensible des immunoessais. L'excès d'anticorps provoque un bruit de fond élevé et on doit déterminer une dilution optimale pour chaque sérum. Les complexes-or sont standardisés à une densité optique de 0.2 à 525 nm.

Méthode 1

1. Placer dans un puits d'une microplaque 25 µL de la suspension virale et 25 µL du sérum immun spécifique dilué dans du tampon PBS-ASB-NaN_3.

2. Incuber 45 min à 37°C en chambre humide. Ajouter 25 µL de protéine A-or et incuber de nouveau 45 min à 37°C.

3. Transférer 50 µL du mélange sur une grille formvar-carbone placée sur une plaque d'agar à 1%. Laisser diffuser la goutte 30 min à la température de la pièce. Ne pas laisser sécher.

4. Laver la grille par immersion successive dans 2 gouttes de tampon, puis 2 gouttes d'eau bidistillée et colorer au KPT 1% pH 7.2.

Méthode 2

1. Le virus *Herpes simplex* concentré par ultracentrifugation à 48 000 x g pendant 90 min est resuspendu dans du PBS (300 µL/mL de milieu de culture centrifugé).

2. Ajouter 20 à 30 µL des différents AcM-or et bien mélanger. Incuber le mélange toute la nuit à la température de la pièce, puis diluer à 5 mL avec du PBS et centrifuger à 27 000 x *g* pendant 20 min.

3. Resuspendre le culot est dans quelques gouttes de KPT 1% pH 6.2

et déposer une goutte sur une grille formvar-carbone. Drainer l'excès de liquide avec un papier filtre.

En couplant chaque anticorps monoclonal à des particules d'or de diamètres différents, il devient possible d'examiner la localisation et la distribution simultanées de deux glycoprotéines de surface.

3.4. LOCALISATION PAR LA MÉTHODE DE PRÉ-ENROBAGE

La méthode de pré-enrobage permet la localisation de macromolécules sensibles aux fixateurs comme c'est le cas pour de nombreux récepteurs de surface des membranes cytoplasmiques ou certaines glycoprotéines virales. Le marquage est effectué sur cellules ou sur des coupes épaisses à congélation de 20 à 100 nm, non fixées ou après une légère fixation au paraformaldéhyde. Les tampons ou milieux de culture utilisés doivent être isotoniques pour les cellules. Après le marquage, les cellules sont postfixées au glutaraldéhyde puis à l'acide osmique (OsO_4) et enrobées dans les résines par les méthodes conventionnelles. Cette technique donne un bon contraste, une excellente préservation de l'ultrastructure ainsi qu'une bonne localisation des macromolécules situées à la surface des membranes cytoplasmiques. En effet, la pénétration des complexes-or à l'intérieur des cellules étant limitée, l'emploi de particules d'or de très petite taille (2 à 3 nm) ou la perméabilisation des membranes par des détergents, Triton X–100, Saponine ou digitonine, devienne alors nécessaires pour la localisation des protéines intracellulaires. Mais, cette perméabilisation, qui parfois démasque certains antigènes, altère généralement l'ultrastructure et peut entraîner la migration des protéines ou une infiltration incomplète des complexes jusqu'aux différents compartiments cellulaires.

Méthode de marquage des cellules en suspension

1. Ajouter 5 µL d'anticorps primaire à 100 µL de cellules (10^7 cellules/mL) resuspendues dans du tampon PBS-ASB-NaN_3. S'il s'agit de lymphocytes humains, ajouter au tampon 1% de sérum humain AB inactivé à la chaleur pour saturer les sites récepteurs des cellules pour le fragment Fc des immunoglobulines.

2. Incuber 30 à 60 min en agitant toutes les 10 min. Rincer avec le tampon 3 fois 5 min par des cycles répétés de centrifugation et de resuspension des cellules.

3. Incuber 30 min avec 25 µL d'anticorps secondaire-or ou de protéine A-or dilué dans du PBS-SAB-NaN_3 pH 7.2. La dilution optimale doit être déterminée expérimentalement.

4. Rincer plusieurs fois avec le tampon.

5. Fixer pendant 30 min au glutaraldéhyde 2% dans du tampon cacodylate 0.1 M pH 7.2.

6. Rincer au tampon cacodylate et postfixer pendant 20 min à l'OsO_4 à 2% dans le même tampon.

7. Laver et colorer en bloc à l'acétate d'uranyle. Déshydrater et enrober dans une résine.

Certains auteurs fixent brièvement avant immuno-marquage les cellules au glutaraldéhyde à 0.25% dans du PBS et effectuent les rinçages et les dilutions des anticorps dans le PBS additionné de 10 mM de monohydrochlorure de lysine pour le blocage des groupements aldéhydes libres.

Méthode de marquage de tapis monocellulaires

Les cellules cultivées dans des plats de Petri résistants à l'acétone et aux époxy, sont traitées et enrobées directement à plat. Autrement, après immunomarquage, les cellules sont grattées et reprises dans de l'agar à 2% avant la déshydratation et l'enrobage en capsule.

3.5. LOCALISATION PAR LA MÉTHODE DE POSTENROBAGE

La localisation des macromolécules s'effectuant sur coupes ultrafines, tout antigène membranaire ou intracellulaire exposé à la surface de la coupe devient accessible aux réactifs. Ces méthodes qui permettent une bonne préservation de l'ultrastructure et une accessibilité directe des macromolécules cibles, offrent la possibilité de localisation simultanée de différentes macromolécules sur la même coupe. L'augmentation de la sensibilité et l'utilisation de faible volume de réactifs à des dilutions souvent élevées constituent d'autres avantages. Les témoins sont effectués sur des coupes sériées et permettent donc une bonne corrélation.

Les facteurs limitants dans les méthodes de post-enrobage découlent du mode de préparation des spécimens, i.e. de la fixation, de la déshydration et de l'enrobage.

3.5.1. Préparation des spécimens

3.5.1.1. Fixation

Les conditions optimales de fixation doivent être soigneusement déterminées pour chaque système de manière à combiner une bonne ultrastructure et un marquage intense. La majorité des bons fixateurs font intervenir des liaisons inter et intramoléculaires ("cross-link") qui modifient la configuration moléculaire et diminuent l'activité biologique des macromolécules. Par ailleurs, une faible fixation peut favoriser l'extraction des macromolécules restées solubles.

La post-fixation à l'acide osmique (OsO_4) est à éviter sauf pour certaines molécules très résistantes à l'OsO_4, ou des molécules qui sont présentes à des concentrations telles que certains sites non affectés par l'OsO_4 restent réactionnels (i.e., les parois de bactéries ou de champignons). Dans certains cas l'activité des molécules doit être restaurée par réoxydation des coupes pendant 30 à 60 min dans une solution aqueuse saturée de sodium métaperiodate (Bendayan et Zollinger 1983).

Le glutaraldéhyde reste le fixateur de choix mais, doit être utilisé aux concentrations les plus faibles possibles, entre 0.1% et 3%. Si l'antigène est sensible, même à de faible concentration de glutaraldéhyde, le formaldéhyde (fraîchement préparée à partir de paraformaldéhyde) peut être utilisée jusqu'à des concentrations de 8%. Des combinaisons paraformaldéhyde-glutaraldéhyde peuvent s'avérer plus efficaces, la glutaraldéhyde à faible concentration 0.05 à 0.1% permettant de stabiliser les structures. Enfin, toujours dans un souci d'améliorer la structure et/ou l'intensité du marquage, des additifs aux fixateurs tels que l'acroléine à 1%, l'acide picrique ou l'acide tannique à 2% ont été suggérés pour favoriser la rétention de certaines macromolécules. D'autres additifs comme le polyvinyl pyrrolidone, PVP–10 de 5 à 10% ou l'éthyl acétimidate améliorent l'immunomarquage. La composition du fixateur (type et concentration du fixateur, le tampon et les additifs) peut être déterminée expérimentalement en microscopie optique ou en "immunodot" pour chaque macromolécule .

3.5.1.2. Enrobage

Différentes résines sont disponibles. Les polyesters et les époxy présentent une forte réactivité et sont de nature hydrophobe, et donc imperméables. Pour les rendre plus hydrophiles il est possible d'ajouter à la résine du sodium méthoxyde ou éthoxyde. Un autre moyen consiste à décaper les coupes fines par un traitement au peroxyde d'hydrogène à 10% ou à l'acide periodique à 1% pendant 10 à 30 min. Une hydrolyse partielle peut aussi être pratiquée à l'aide d'une solution à 1% de sodium hydroxyde alcoolique pendant 30 sec suivie de rinçages à l'alcool à 100% puis à 50%. Par contre, bon nombre de macromolécules et les sites récepteurs des lectines ou les protéines du cytosquelette, en particulier, sont peu préservées par l'enrobage à l'Epon ou à l'Araldite. D'autre part, beaucoup d'anticorps monoclonaux ont du mal à identifier leurs épitopes homologues à la surface de coupes d'époxy.

Les méthacrylates apparaissent supérieurs aux époxy. D'abord ces résines sont hydrophiles et de plus, la déshydratation aux solvants organiques, responsables de dénaturation et d'extraction. Par contre, les méthacrylates ont tendance à se rétracter au cours de la polymérisation, entraînant une moins bonne préservation de l'ultrastructure.

Une nouvelle génération de résines, des acryliques, pourraient permettre une nette amélioration en immunocytochimie. Les résines L.R. White avec polymérisation à chaud ou le L.R. Gold avec polymérisation à froid sous UV (–20°C) donnent des résultats satisfaisants. Un autre acrylique hydrophile, le Lowicryl K4M avec une déshydratation à –20°C et une polymérisation à –35°C sous lampe UV permet une meilleure préservation à la fois de l'ultrastructure et de l'activité biologique des macromolécules, malgré des fixations légères. Avec cette résine, le bruit de fond reste très faible. Le Lowicryl constitue la résine de choix pour la localisation des sites de fixation des lectines et de plusieurs autres macromolécules sensibles aux époxy, dont les protéines du cytosquelette.

Finalement, techniquement plus délicates, les méthodes d'ultracryotomie qui permettent une meilleure accessibilité des structures cellulaires aux réactifs, lorsque combinées, après le marquage, avec un enrobage dans les résines conventionnelles, donnent des résultats très similaires à ceux obtenus en méthode de pré-enrobage tout en localisant les macromolécules intra-cellulaires.

3.5.2. Méthode d'immuno-or colloïdal

3.5.2.1. Modèle de fixation

1. Fixer les tissus ou les cellules pendant 20 min à 2 h à la température de la pièce avec un mélange de paraformaldéhyde 3% et de glutaraldéhyde 0.1% dans du PBS ou dans du milieu balancé de Hanks. Ajouter au fixateur 4% de polyvinyl pyrrolidone (30 000) et 70 mM de $NaNO_2$.

2. Rincer les spécimens dans le même tampon, 2 fois 15 min, puis dans une solution de 50 mM de NH_4Cl pour bloquer les groupements aldéhydes libres, pendant 30 à 60 min.

3. Rincer toute la nuit dans le tampon phosphate.

4. Déshydrater et enrober dans la résine choisie.

5. Préparer des coupes ultrafines sur grilles de nickel nues ou recouvertes d'un film support formvar-carbone.

3.5.2.2. Immunomarquage

La coloration est pratiquée sur des gouttes des différents réactifs placées sur du Parafilm™ ou à l'intérieur de puits d'une microplaque. Il ne faut pas assécher les grilles entre les différentes étapes, et toutes les solutions doivent être filtrées 0.22 µm ou centrifugées.

1. Prétraiter, si nécessaire, les coupes à l'acide periodique 1% ou au peroxyde d'hydrogène à 10% pendant 10 à 30 min. L'hydrolyse par des enzymes protéolytiques peut s'avérer utile pour démasquer certains antigènes.

2. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée avant les étapes d'immunomarquage.

3. Faire flotter les coupes pendant 5 min sur une goutte de PBS-ASB ou PBS-ovalbumine 1% ou PBS-Tween 0.05%.

4. Transférer la grille sur 10 à 20 µL d'anticorps primaire dilué dans le même tampon et incuber 60 min à la température de la pièce.

5. Rincer sur plusieurs gouttes de PBS-Tween ou PBS-ASB pour une période de 20 min.

4. Déposer la grille sur la protéine A-or ou sur l'anticorps secondaire-or, dilué dans du PBS ou du TBS et incuber pendant 60 min à la température de la pièce. **Le complexe-or n'est pas dilué en présence de Tween qui semble déstabiliser l'ensemble des *réactions*.**

7. Laver la grille avec le tampon d'abord sur des gouttes ensuite avec un flacon gicleur et finir le rinçage à l'eau bidistillée.

8. Colorer à l'acétate d'uranyle aqueux à 2% et au citrate de plomb. L'acétate de plomb de Millonig est recommandé pour les résines à base d'acrylique.

Certains ajoutent du sérum normal (1 à 5%) de l'espèce animale fournissant l'anticorps secondaire, aux tampons de rinçage et de dilution, et recommandent de travailler à pH 8 avec les immunoglobulines-or. Selon le diamètre des particules d'or, les dilutions sont standardisées au spectrophotomètre à une absorbance de 0.44 à 525 nm pour la protéine A-or 14 nm et de 0.06 pour celle de 10 nm.

Pour le **marquage double**, employer l'une des trois méthodes suivantes:

A) Effectuer la coloration en séquence avec chaque système anticorps primaire-complexe-or homologue en veillant à bloquer les sites non spécifiques entre chaque système. Ill s'agit d'incuber les coupes après le premier marquage avec un excès de protéine A (50 µg/mL) non marquée ou d'immunoglobulines non marquées de la même espèce animale que celle des immunoglobulines utilisées dans le deuxième système.

B) Appliquer simultanément les deux Ac primaires produits chez deux espèces animales différentes. Après les étapes d'incubation et de rinçage, faire réagir un mélange correspondant de deux anticorps secondaires homologues couplés à des particules d'or de diamètres différents.

C) Marquer séparément et alternativement chaque face des coupes placées sur grille nue, avec chacun des systèmes anticorps primaires-anti-

corps secondaire ou la protéine A couplée à l'or d'un diamètre particulier (Figure 3b).

3.5.2.3. Enzyme-or

1. Déposer pendant 5 min les coupes montées sur grille nickel sur du PBS à pH 6 pour l'ADNase-or ou à pH 7.5 pour l'ARNase-or.

2. Transférer les grilles sur le complexe nucléase-or, dilué dans le PBS au pH d'activité de la nucléase, pendant 30 min à la température de la pièce.

3. Rincer au PBS puis à l'eau distillée et colorer. Le rinçage peut être critique; s'il est trop prolongé, les complexes-or peuvent décrocher.

Les contrôles de spécificité incluent le prétraitement des coupes par les nucléases non marquées ou la neutralisation de l'activité nucléase par son substrat (ADN ou ARN à raison de 1 mg/mL) avant le marquage (Figure 4).

3.5.2.4. Lectine-or

Méthode directe

1. Placer les grilles sur du PBS pendant 5 min.

2. Incuber avec différentes concentrations de la lectine-or diluée dans du PBS **au pH optimal pour chaque lectine.**

3. Rincer 3 fois au PBS pendant 2 à 3 min.

4. Une fixation à la glutaraldéhyde 2.5% dans le PBS pendant 5 à 10 min, prévient le décollement des complexes qui pourrait se produire à cause des grandes variations de pH au cours de la coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

5. Rincer de nouveau au PBS, laver à l'eau bidistillée et contraster les coupes.

Méthode indirecte.

1. Incuber les coupes sur différentes concentrations (2.5 à 250 µg/mL) de concanavaline-A (ConA) ou de l'agglutinine de germe de blé (WGA) pendant 30 min, puis rincer 2 fois au PBS au pH optimal.

2. Placer les coupes sur différentes concentrations des complexes peroxydase-or (2.5 à 50 µg/mL) pour la ConA, ou ovomucoïde-or pour la WGA et incuber 30 min à la température de la pièce.

3. Rincer et procéder tel que décrit précédemment.

   Les contrôles de spécificité doivent comprendre:

   (i) une préincubation de la lectine-or avec le sucre ou le glycopeptide bloquant,

   (ii) une préincubation des coupes avec la lectine non couplée,

   (iii) un traitement des coupes par des glycosidases, des protéases ou d'autres réactifs tel que l'acide periodique qui neutralisent l'activité du groupement hydrate de carbone visé.

3.5.2.5. Streptavidine-or

Dans cette méthode, les anticorps primaires ou les lectines sont biotinylés. Après incubation des coupes avec les macro-

molécules biotinylées, à la bonne dilution dans le tampon requis, celles-ci sont transférées sur de la streptavidine-or dilué dans du PBS. Pour obtenir de bons résultats utiliser plutôt l'anticorps primaire, puis un anticorps secondaire biotinylé, et ensuite la streptavidine-or. Les contrôles doivent démontrer l'absence de biotine endogène.

3.5.2.6. Hybridation *in situ*

La localisation de séquences d'acides nucléiques par hybridation *in situ* constitue une approche importante dans le diagnostic. Le développement des méthodes de couplage des sondes d'ADN ou d'ARN à la biotine, plutôt qu'à des radioisotopes, ouvre la voie à une méthode d'hybridation *in situ*, rapide, de grande affinité et plus spécifique que les méthodes d'hybridation par autoradiographie. De plus, les sondes liées à la biotine se conservent longtemps et ne présentent pas de risque de manipulation.

La localisation d'acides nucléiques bicaténaire et en particulier des ADN viraux a été réalisée avec des sondes biotinylées en microscopie optique sur coupes à la paraffine ou sur frottis cellulaires à l'aide de l'immunoperoxydase ou de l'immunofluorescence, et rien n'interdit l'application de l'immuno-or. Dans cette méthode, les acides nucléiques bicaténaires doivent être dénaturés pour séparer les deux brins et permettre une hybridation d'un des brins avec la sonde biotinylée complémentaire. Cette dénaturation constitue la difficulté majeure à l'adaptation de cette méthode *in situ* en microscopie électronique pour la localisation de segments d'ADN intimement imbriqués dans les résines d'enrobages. Par contre, elle est réalisable sur des chromosomes isolés et montés sur grilles, après dénaturation de l'ADN soit dans un tampon à pH ajusté à 12 ou 13 avec du NaOH 1 N ou dans une solution tamponnée de formamide à 70%. Les acides nucléiques monocaténaires sont, pour leur part, directement accessibles sur coupes.

3.5.2.6.1. Hybridation *in situ* en microscopie optique

Prétraitement

1. Déparaffiner les coupes histologiques qui ont été placées la veille à 60°C, puis les réhydrater et les sécher. Les frottis de cellules sont fixés au Carnoy ou à l'acétone.

2. Hydrolyser les coupes ou frottis avec du HCl 0.1 N pendant 20 min, les rincer 6 min dans un tampon 2X SSC (NaCl 0.3 M, citrate de sodium 0.03 M, pH 7) et les traiter à la protéinase K, 50 µg/mL dans du TBS pH 7.4 $CaCl_2$ 2 mM, pendant 15 min à 37°C.

3. Rincer les coupes 4 fois 3 min avec du PBS renfermant 0.2% de glycine (p/v) puis les plonger dans du triéthanolamine 0.1 M ajusté à pH 8 avec du HCl 1 N contenant 5 mL/L d'acide acétique. Les rincer à l'eau distillée, puis les déshydrater à l'alcool et les sécher à l'air.

Hybridation de l'ADN

1. Hydrolyser l'ARN cellulaire par une digestion à l'ARNase A (100 µg/mL) et l'ARNase T1 (10 U/mL) dans un tampon 2X SSC-EDTA 0.001% et 5% de glycérol, pendant 30 min à 37°C.

2. Inactiver les ARNases par deux lavages de 5 min, sous agitation, dans du 2X SSC contenant 0.2% de diéthyl pyrocarbonate, puis rincer les coupes 2 fois 5 min dans le 2X SSC et les déshydrater.

3. Juste avant l'hybridation, fixer pendant 2 h l'ADN cellulaire à la paraformaldéhyde 5% dans du NaCl 0.3 M à pH 7, puis laver les coupes 2 fois à l'eau bidistillée et les déshydrater à l'alcool.

4. Pour compléter la dénaturation de l'ADN, placer les lames pendant 15 min dans une solution à 65°C contenant 95% de formamide fraîchement déionisée préparée dans du SSC 0.1X .

5. Recouvrir le spécimen de 20 µL de la solution d'hybridation constituée de 2 µg/mL de la sonde ADNc-biotinylée (dénaturée par chauffage à ébullition pendant 2 min suivie d'un refroidissement brusque sur un bain de glace), de 400 µg/mL d'ADN de sperme de hareng soumis aux ultrasons, de 50% de formamide, de 10% de sulfate de dextran , de 1% de ASB, de 0.02% de Ficoll, et de 0.02% de polyvinyl pyrrolidone (10 000), le tout mélangé, dans du tampon SSC 2X pH 7.

6. Déposer une lamelle par dessus, et la sceller.

7. Transférer les lames à 90°C pendant 6 min ou les soumettre à un jet de vapeur à 80°C pendant 10 min. Refroidir brusquement les lames sur de la glace, pour provoquer un choc thermique dénaturant pour l'ADN cellulaire et l'ADNc.

8. Laisser hybrider de 15 min à 50 h à 42°C, en chambre humide.

Hybridation de l'ARN

1. Recouvrir les coupes semi-fines des tissus enrobés au Lowicryl ou les coupes histologiques déparaffinées de 20 µL de la solution d'hybridation puis recouvrir d'une lamelle et sceller.

2. Laisser hybrider à 37°C pendant 5 à 10 h.

Réaction avec la protéine A-or

1. Après l'hybridation de l'ARN ou de l'ADN, retirer la lamelle et rincer les coupes au PBS 5 fois 5 min avant le marquage.

2. Incuber les lames 2 h à la température de la pièce, avec un anticorps anti-biotine dilué dans du PBS-ASB-Triton-Tween-NaN_3, et rincer au PBS 2 fois pendant 5 min (voir section 3.2.2).

3. Incuber les coupes pendant 1 h avec de la protéine A-or diluée dans le PBS .

4. Les rincer au PBS 2 fois 5 min et les incuber à nouveau 2 h avec un anticorps anti-protéine A dilué dans le même tampon. Rincer 2 fois 5 min au PBS, puis effectuer une dernière incubation de 1 h avec de la protéine A–or.

5. Rincer les coupes 2 fois 2 min au PBS puis 1 fois à l'eau distillée et les laisser sécher à l'air.

Une intensification à l'argent peut être pratiquée (voir section 3.2.1) ainsi qu'une contre-coloration de 20 sec au bleu de toluidine à 0.1% pour les coupes au Lowicryl, ou avec 0.5% de Fast Green ou à l'hématoxyline de Gill pour les coupes histologiques. Une solution consiste à incuber les coupes, après le sérum de lapin anti-biotine, avec un sérum de chèvre anti–IgG de lapin-biotinylé suivi de la streptavidine-or. Dans ce cas, du sérum normal de chèvre à 1% est ajouté dans le tampon de rinçage.

3.5.2.6.2. Hybridation *in situ* en microscopie électronique pour les ARN

L'hybridation *in situ* n'a été appliquée en microscopie électronique que sur coupes de tissus enrobés au Lowicryl K4M. Les coupes de tissus fixés au paraformaldéhyde 4% et glutaraldéhyde 0.08% dans du PBS 0.1 M à pH 7.4 sont placées sur grilles–or recouvertes d'un film support formvar-carbone.

1. Chauffer les coupes 1 h à 60°C, puis les incuber entre 1 h à 48 h à 40°C avec le mélange d'hybridation.

2. Rincer les grilles 1 fois au formamide à 50% dans 2X SSC pendant 10 min, puis 3 fois 15 min dans du PBS et procéder à l'immunomarquage tel que décrit précédemment.

4. CONCLUSION

Les méthodes à l'or colloïdal décrites dans ce chapitre ne représentent qu'une introduction aux méthodes disponibles dans un laboratoire de microscopie électronique conventionnel, pour la localisation et l'identification des protéines et des acides nucléiques viraux ou pour la caractérisation des sondes d'ADN ou d'ARN et des anticorps monoclonaux. D'autres méthodes plus élaborées ou nécessitant de l'équipement particulier sont également utilisables.

La technique des répliques permet l'étude spécifique des surfaces des cellules ou des virus bourgeonnants. Les cellules fixées aux aldéhydes sont soumises à la séquence de marquage avant d'être postfixées à l'OsO_4. Elles sont ensuite déshydratées, séchées au point critique et une réplique est préparée par évaporation de carbone ou de platine-carbone. Cette technique a permis, entre autres, l'étude de la surface de plusieurs virus enveloppés, de leurs bourgeonnements sur les membranes et de leur relations avec le cytosquelette, en particulier pour le virus de la rougeole, le virus Maloney de la leucémie murine, ou le virus de l'immunodéficience acquise (HIV).

La technique de cryodécapage ou cryofracture en combinaison avec les complexes–or apporte aussi une importante contribution à l'étude du mode de bourgeonnement des virus sur les membranes ainsi qu'à la localisation de macromolécules intra membranaires. Il ne faudrait pas oublier de mentionner l'introduction de l'or en microscopie à balayage, qui apporte un complément précieux à l'étude de la surface cellulaire et du bourgeonnement des virus .

L'or colloïdal apparaît de plus en plus comme un marqueur polyvalent, universel et très sensible. Son application s'étend à tous les champs de la microscopie et de la biologie cellulaire. Les marqueurs à l'or sont facilement identifiables et grâce à une bonne préservation de la structure, la relation structure-réactifs devient précise. Ils peuvent être utilisés au marquage double et même triple de différentes macromolécules intra- ou extracellulaires, ou en combinaison avec les autres techniques immunocytochimiques. D'autre part, contrairement aux autres méthodes immunocytochimiques strictement qualitatives, l'or colloïdal permet d'effectuer des évaluations quantitatives.

L'avènement des anticorps monoclonaux, des sondes d'ADN ou d'ARN, et le développement du génie génétique, constituent de nouveaux champs d'exploration mais aussi de nouveaux outils pour le microscopiste, dans sa recherche de la caractérisation des cellules et de leur

mode de fonctionnement. La maîtrise d'un marqueur aussi polyvalent et flexible que l'or colloïdal devient alors un important atout à l'avancement de ces travaux. Ce n'est pas sans raison que l'or colloïdal est devenu le marqueur le plus important et le plus utilisé en immunocytochimie et en virologie.

Mes sincères remerciements au docteur Moïse Bendayan, à Henry Strykowski et à Gisèle Amzallag pour leur contribution, ainsi qu'à Carole Arsenault et Annie Tremblay pour la dactylographie.

5. RÉFÉRENCES

Beesley, J.E. 1986. The use of gold markers in immunocytochemical studies of microbiological organisms: a review. J. Microsc. 143: 177-186.

Bendayan, M. 1981. Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme-gold complexes. J. Histochem. Cytochem. 29: 531-541.

Bendayan, M. 1982. Double immunocytochemical labelling applying the protein A-gold technique. J. Histochem. Cytochem. 30: 81-85.

Bendayan, M. 1984a. Protein–A-gold electron microscopic immunocytochemistry methods, applications and limitations. J. Electr. Microsc. Techn. 1: 243-270.

Bendayan, M. 1984b. Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: a new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. J. Elect. Microsc. Techn. 1: 349-372.

Bendayan, M. 1987. Introduction of the protein G-gold complex for high resolution immunocytochemistry. J. Electr. Microsc. Techn. 6: 7-14.

Bendayan, M. et Zollinger, M. 1983. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. J. Histochem. Cytochem. 31: 101-109.

Bendayan, M. et Garzon, S. 1988. Protein-G-gold complex: comparative evaluation with the protein-A-gold for high resolution immunochemistry. J. Histochem. Cytochem. 36: 597-607.

Binder, M., Tourmente, S., Roth, J., Renaud, M. et Gehring, W.J. 1986. *In situ* hybridization at the electron microscope level: localization of transcript on ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A-gold complexes. J. Cell Biol. 102: 1646-1653.

Bullock, G.R. et Petrusz, P. 1982. *Techniques in immunocytochemistry*, Academic Press, N.Y., Volume 2 et 3.

De Mey, J.R. 1983a. Colloïdal gold probes in immunocytochemistry. Dans *Immunocytochemistry, practical applications in patholoy and biology* Edité par Polak, J.M. et Van Noorden, S. Wright-PSG, pages 82-112.

De Mey, J.R. 1983b. The preparation of immunoglobulin gold conjugates (IGS reagents) and their use as markers for light and electron microscopic immunocytochemistry. Dans *Immunocytochemistry* Edité par Cuello, A.C., Ibro, pages 347-372.

Garzon, S., Bendayan, M. et Kurstak, E. 1982. Ultrastructural localization of viral antigens using the protein A-gold technique. J. Virol. Meth. 5: 67-73.

Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Özel, M., Pauli,G. et Koch,M.A. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. Virology 156: 171-176.

Goodman, S.L., Hodges, G.M. et Livingston, D.C. 1980. A review of the colloïdal gold marker system. In *Scanning electron microscopy II.* Edité par Johari, O., Chicago SEM, Inc., AMF O'Hare, pages 133-146.

Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L.K. et Livingston, D.C. 1981. Colloïdal gold markers and probes for routine application in microscopy. J. Microsc. 123: 201-213.

Harmon, S.A., Robinson, E.N. Jr. et Summers, D.F. 1985. Ultrastructural localization of L and NS enzyme subunits on vesicular stomatitis virus RNPs using gold sphere-Staphylococcal protein A-monospecific IgG conjugates. Virology 142: 406-410.

Hopley, J.F.A. et Doane, F.W. 1985. Development of a sensitive protein A-gold immunoelectron microscopy method for detecting viral antigens in fluid specimen. J. Virol. Meth. 12: 135-147.

Hyatt, A.D., Eaton, B.T. et Lunt, R. 1987. The grid-cell-culture technique: the direct examination of virus infected cells and progeny viruses. J. Microsc. 145: 97-106.

Murti, K.G. et Webster, R.G. 1986. Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immuno-electron microscopy. Virology 149: 36-43.

Polak, J.M. et Varndell, I.M. 1984. *Immunolabelling for electron microscopy,* Elsevier,

Roth, J. 1983b. Application of lectin-gold complexes for electron microcopic localization of glycoconjugates on thin sections. J. Histochem. Cytochem. 31: 987-999.

Roth, J. 1986. Post-embedding cytochemistry with gold-labelled reagents: a review. J. Microsc. 143: 125-137.

Slot, J.W. et Geuze, H.J. 1984. Gold markers for single and double immunolabelling of ultrathin cryosections. Dans *Immunolabelling for electron microscopy* Edité par Polak, J.M. et Varndell, I.M., Elsevier, pages 129-142.

Slot, J.W. et Geuze, H.J. 1985. A new method of preparing gold probes for multiple labelling cytochemistry. Eur. J. Cell Biol. 38: 87-93.

Stannard, L.M., Fuller,A.O. et Spear, P.G. 1987. Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. J. Gen. Virol. 68: 715-725.

Tijssen, P. 1985. *Practice and theory of enzyme immunoassays.* Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Volume 15. Elsevier, 549 pages.

Tokuyasu, K.T. 1986. Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. J. Microsc. 143: 139-149.

Webster, H. de F., Lamperth, L., Favilla, J.T., Lemke, G., Tesin, D. et Manuelidis, J. 1987. Use of biotinylated probe and "in situ" hybridization for light and electron microscopic localization of P0 mRNA in myelin-forming Schwann cells. Histochem. 86: 441-444.

19

RADIO-MARQUAGE MÉTABOLIQUE ET CHIMIQUE

André Fafard

1. INTRODUCTION

Le marquage radioactif des principales classes de macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, polysaccharides et lipides) constitue un outil de base en virologie. Le marquage des acides nucléiques intervient dans la cartographie oligonucléotidique, le séquençage, l'étude des mécanismes biochimiques du contrôle de la transcription et de l'expression génétique et dans la préparation de sondes. Le marquage des protéines intervient dans l'étude de la traduction des ARNm, son contrôle, la modification subséquente de protéines pré-sécrétoires, la localisation et l'assemblage de structures protéiques et, enfin, dans la préparation de réactifs radio-immunologiques. Le marquage des polysaccharides et des lipides est moins couramment employé. Les anticorps monoclonaux, qui sont des glycoprotéines, peuvent être marqués dans leur portions oligosaccharidiques. Le marquage de lipides peut être employé dans l'investigation de membranes artificielles, les liposomes, et de membranes naturelles.

La sélection d'une méthode de marquage radioactif, selon l'application, se fait soit parmi les méthodes d'incorporation métabolique *in vivo* de précurseurs appropriés, soit par l'incorporation métabolique, *in vitro*, en culture cellulaire ou en système acellulaire, ou encore par l'addition enzymatique ou chimique *in vitro* d'un radio-isotope. Ces options impliquent des choix de type de radioactivité (bêta ou gamma), d'énergie d'émission, de demi-vie physique et biologique, d'activité spécifique et de distribution intramoléculaire de marquage (Tableau 1).

Le système d'unités physiques retenu est le système international (SI) adopté par la Commission Internationale des Unités de Radiation (C.I.U.R.). Dans ce système l'unité de radioactivité est le becquerel (Bq) et correspond à une désintégration radioactive par seconde ou 2.7×10^{-11} curie dans l'ancien système. L'unité d'énergie absorbée est le gray (Gy) égal à 1 joule/kilogramme ou 100 rads dans l'ancien système. Enfin, l'unité d'équivalence de dose est le sievert (Sv) et correspond à 100 rems dans l'ancien système.

Tableau 1

Paramètres nucléaires des principaux radio-isotopes

Nucl.	Z	$t_{1/2}$	λ (sec^{-1})	Activité spécifique (TBq/mA)	Énergie gamma (Mev)	Énergie bêta (Mev)	Iγ (mGr/h /GBq)	Organes cibles	Dose par MBq interne (Sv)
^{3}H	1	12.3a	$1.79x10^{-9}$	1.07		0.018		corps entier	$5.70x10^{-5}$
^{14}C	6	5730a	$3.81x10^{-12}$	$2.3x10^{-3}$		0.155		graisses	$6.50x10^{-4}$
^{32}P	15	14.3j	$5.60x10^{-7}$	338		1.70		os	$1.03x10^{-2}$
								tractus G.I.	$5.70x10^{-3}$
^{35}S	16	86.7j	$9.20x10^{-8}$	55.7		0.17		testicules	$2.70x10^{-3}$
								peau	$4.60x10^{-4}$
^{51}Cr	24	27.8j	$2.90x10^{-7}$	174	0.32		49	tractus G.I.	$3.20x10^{-4}$
								prostate	$1.00x10^{-6}$
								thyroïde	$1.00x10^{-6}$
^{60}Co	27	5.26a	$4.19x10^{-9}$	2.52	1.17	0.31	3541	tractus G.I.	$1.05x10^{-3}$
								pancréas	$7.02x10^{-4}$
								foie	$5.70x10^{-4}$
^{111}In	49	2.8j	$1.20x10^{-6}$	1725	0.17				
					0.25				
^{125}I	53	60.2j	$1.33x10^{-7}$	80.2	0.035		162	thyroïde	0.16
^{131}I	53	8.05j	$9.93x10^{-7}$	600	0.360	0.61	595	thyroïde	0.51
					0.720	0.81			

Les quelques notions qui suivent permettent de relier quantitativement la radioactivité, la masse, l'activité spécifique et l'incorporation. La masse de radio-isotope correspondant à une radioactivité se calcule avec l'équation:

$$W = 2.07 \times 10^{-4} \times TBq \times t_{1/2}$$

où W = la masse en milligram-atomes

TBq = la radioactivité en térabecquerels (TBq = 10^{12} Bq)

$t_{1/2}$ = la demi-vie physique du radio-isotope (en jours)

La masse en milligrammes est donc W divisé par la masse atomique du radio-isotope (exemple: 125 pour l'iode[125]).

L'activité spécifique (AS) d'un isotope pur se calcule avec l'équation précédente transformée:

$$AS = \frac{TBq}{W} = \frac{4831}{t_{1/2}}$$

où AS est exprimé en térabecquerels/ milligramatome (mGr). La demi-vie physique ($t_{1/2}$) caractéristique d'un radionucléide est le temps requis pour que la radioactivité d'une population de ce radionucléide décroisse de moitié. La radioactivité décroît exponentiellement selon l'équation:

$$N_t = N_o \times e^{-\lambda t}$$

Dans laquelle:

N_o = la radioactivité initiale

N_t = la radioactivité après t secondes

λ = la constante de radioactivité caractéristique de chaque radionucléide en sec^{-1}

Il découle de l'équation précédente que

$$N_t = N_o \cdot e^{-0.693t/t_{1/2}}$$

Ainsi, connaissant la demi-vie d'un radio-isotope ($t_{1/2}$) et la radioactivité (N_o) d'un échantillon à un moment donné, il est possible de déterminer sa radioactivité (N_t) à tout autre moment après un temps déterminé (t).

Il est nécessaire de connaître les caractéristiques physiques des radio-isotopes employés de manière à guider le choix des méthodes de détection ou de comptage et des mesures de radio-sécurité appropriées. Les paramètres pertinents sont résumés sous la forme d'un tableau pour les radionucléides d'usage courant. Les valeurs Iγ données dans ce tableau correspondent à la dose absorbée par voie externe à 1 centimètre d'une source par heure par gigabecquerel (10^9Bq) de radioactivité. Ce paramètre permet de calculer la dose absorbée (D) en mGr/h à toute distance (d) en centimètres d'une source de radioactivité exprimée en gigabecquerels (Gb) avec l'équation:

$$D = \frac{I\gamma\, Gb}{d^2}$$

Les expositions internes à l'organe critique données dans le tableau, résultant de l'ingestion de radio-isotopes, sont estimées à partir de leurs demi-vies physiques et biologiques.

Lors de manipulations, l'exposition devrait être maintenue inférieure à 0.02 mSv/h soit par l'emploi d'écrans protecteurs, s'il y a lieu, soit simplement en limitant la durée des manipulations et en maintenant la source à distance. La contamination interne peut être minimisée en travaillant sous une hotte chimique avec les radio-isotopes volatiles tels que l'iode et, de façon générale, en adoptant des méthodes analogues aux méthodes aseptiques.

2. ACIDES NUCLÉIQUES

Les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques peuvent être marqués par incorporation métabolique de l'un ou l'autre des nucléotides radioactifs parmi une large sélection disponible commercialement. Plusieurs méthodes enzymatiques permettent également l'incorporation *in vitro* de ces mêmes précurseurs. Des méthodes chimiques de radiomarquage et plus particulièrement de radioiodation existent. Les radio-isotopes employés comme marqueurs des acides nucléiques sont le phosphore–32, le soufre–35, le tritium, le carbone–14 et l'iode–125. Les précurseurs marqués avec les autres radio-isotopes peuvent généralement être substitués dans les méthodes décrites ici pour le phosphore–32.

L'efficacité d'une méthode de marquage est évaluée par le degré d'incorporation du radio-isotope. Pour ce faire, appliquer sur un filtre de 2.45 cm Whatman GF/C en fibre de verre un volume précis du milieu de réaction n'excédant pas 10 µL. Placer le même aliquot dans 100 µl d'ADN porteur 500 µg/mL dans l'EDTA 20 mM. Ajouter 5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 10% glacé, mélanger et incuber 15 min sur la glace. Recueillir sur un second filtre GF/C identique le précipité TCA. Rincer le filtre avec six autres aliquots de 5 mL de TCA 10% glacé suivi de 5 mL d'éthanol 95%. Assécher les deux filtres, ajouter un cocktail de scintillation et compter la radioactivité. Le rapport de

la radioactivité TCA précipitable et de la radioactivité initiale représente la fraction d'incorporation.

2.1. MARQUAGE *IN VIVO*

Les acides nucléiques viraux peuvent être marqués par voie métabolique sur culture cellulaire en présence de précurseurs radioactifs dont le phosphore–32 inorganique et les nucléotides marqués au ^{32}P, ^{3}H, ^{14}C, ^{125}I ou ^{35}S. L'incorporation *in vivo* d'orthophosphate (^{32}P) de sodium produit des acides nucléiques uniformément marqués, ce qui est idéal pour la cartographie oligonucléotidique. L'incorporation d'un précurseur radioactif est favorisée par l'emploi d'un milieu de culture déficient de la version non-radioactive de ce précurseur. Toutefois, un choix doit parfois être fait entre une incorporation élevée et la réplication efficace du virus. L'emploi d'une quantité réduite de sérum de fœtus de veau de même que des volumes réduits de milieu de culture favorise également l'incorporation efficace du radio-isotope.

Avec le phosphore–32 inorganique, la concentration choisie (5 à 100 MBq) est ajoutée 1 à 10 h post-infection au milieu de culture dépourvu de ou déficient en phosphate. Avec les virus qui ne produisent pas d'infection lytique, le marqueur est ajouté au moment où les cellules répliquent le virus au taux maximum. Le travail de Shaw *et al.* (1977) avec l'ADN viral EBV qui se réplique dans les cellules Raji surinfectées est un exemple de marquage d'ADN *in vivo* avec le phosphore–32 inorganique. Le travail de Meinkoth et Kennedy (1980) avec le virus de la forêt de Semliki répliqué dans la lignée cellulaire murine L929 est un exemple avec un virus à ARN.

2.2. TRANSCRIPTION ACELLULAIRE *IN VITRO*

Un système acellulaire d'extrait de cellules HeLa a été développé par Manley *et al.* (1980) pour l'étude des mécanismes biochimiques du contrôle de la transcription et de l'expression génétique chez les eucaryotes. La transcription en ARNm d'ADN exogène lié à un promoteur dépend de l'ARN polymérase II d'origine cellulaire caractérisée par sa propriété d'être inhibée par l'α–amanitine. Ce système n'est pas recommandé pour la préparation de sondes d'hybridation, les autres méthodes décrites étant mieux adaptées à cette fin.

2.3. MARQUAGE ENZYMATIQUE *IN VITRO*

2.3.1. Synthèse d'ARNc

Les ARN polymérases de bactériophages dont celle du bactériophage SP6 de *Salmonella thyphimurium* ou du bactériophage T7 de *E.coli* sont caractérisées par leurs exigences très spécifiques en termes de segments de promotion et de terminaison et par un taux de transcription supérieur d'un ordre de grandeur à celui de l'ARN polymérase de *E.coli*. Les ARN polymérases de bactériophages se recyclent plus efficacement que les polymérases d'origine bactérienne. En pratique, les fragments d'ADN à être transcrits sont clonés dans les vecteurs pSP64 ou pGEM™-2 porteurs des promoteurs des ARN polymérases de SP6 et T7 respectivement, immédiatement en amont de sites de clonage multiples. Pour la transcription, l'ADN recombinant est linéarisé avec une enzyme de restriction qui scinde le plasmide en aval du promoteur et de l'insertion d'ADN. Des copies d'ARN spécifiques homogènes résultent de la

transcription *in vitro* par la polymérase du bactériophage. Dans ce système, l'emploi d'enzymes de restriction générant des extrémités saillantes produit des quantités significatives de longues copies d'ARN complémentaires au vecteur. Lorsque ces enzymes de restriction doivent être employées, ce problème peut être évité en comblant les extrémités 5' saillantes avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase.

Les ARN polymérases de phages peuvent être employées pour préparer des sondes à partir d'oligonucléotides synthétiques comportant, en plus de la séquence d'hybridation à l'extrémité 3', la séquence tétranucléotidique de l'ADN du site de restriction *Pst* 1. Ils sont recombinés avec les vecteurs pSP64 ou pGEM™–2 linéarisés avec *Pst* 1. L'ADN polymérase de *E.coli* complète le brin complémentaire à l'oligonucléotide synthétique puis la transcription est faite par l'ARN polymérase de bactériophage en présence de précurseurs radioactifs pour produire les sondes d'ARN.

Solutions

Tampon ARN polymérase 5X

Tris HCl pH 7.9 ..... 0.2M

$MgCl_2$ ..... 30 mM

Spermidine ..... 10 mM

Dithiothréitol ..... 50 mM

NaCl ..... 50 mM

Méthode

1. Scinder le plasmide recombinant avec l'enzyme de restriction approprié, puis faire l'extraction au phénol: chloroforme et la précipitation à l'éthanol de l'ADN linéarisé selon les méthodes standards.
2. Placer dans un microtube placé sur de la glace:

   ADN linéarisé ..... 0.2–1 µg

   Tampon ARN polymérase 5X ..... 10 µL

   NTP (2.5 mM chacun des quatre) ..... 10 µL

   RNAsin® (Promega Biotec, Madison, Wisconsin) ..... 50 U

   (α^{-32}P) GTP ou [α^{-32}P] CTP, 100 TBq/mmole ..... 10 MBq

   H_2O bidistillée à ..... 50 µL

3. Initier la réaction avec 2–10 unités d'ARN polymérase de SP6 ou T7 et incuber à 37 ou 40°C respectivement pendant 1 h. Ajouter 50 µg d'ARNt porteur et 15 µg de DNAse contenant 70 unités de RNAsin™ puis incuber la réaction 10 min. Faire l'extraction au phénol: chloroforme et la précipitation à l'éthanol de l'ARNc marqué selon les méthodes standards.

2.3.2. Synthèse d'ADNc par la transcriptase inverse

De courtes sondes d'ADNc peuvent être synthétisées sur matrices ARN ou ADN monocaténaire avec une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse) tel que la transcriptase inverse du rétrovirus de la myéloblastose aviaire (VMA). Certaines conditions optimales favorisent l'obtention de copies intégrales pour la préparation d'ADN recombinant. La synthèse d'ADNc requiert, en plus d'une matrice et d'une transcriptase inverse, la présence d'une amorce pour la réaction d'addition. Ces amorces sont des séquences d'oligonucléotides dont la séquence complémentaire se retrouve dans la matrice. Elles peuvent être des

séquences homopolymériques tels que les oligo (dT) qui se lient aux séquences 3' terminales des ARN messagers (ARNm) ou d'autres oligo (dNTP) se liant à des séquences terminales synthétiques complémentaires.

L'ATP:ARN adényltransférase peut être employée pour greffer une terminaison 3' polyadénylique aux ARN viraux. Enfin, des séquences aléatoires préparées à partir d'ADN de thymus de veau ou de sperme de saumon sont également des amorces efficaces avec tout ARN de plus de 660 bases. Avec les ARN de moins de 330 bases, les amorces aléatoires produisent peu ou pas d'ADNc.

2.3.3. Synthèse d'ADN par mécanisme de réparation ("Nick translation" ou coupure-substitution)

Des sondes radioactives ADN peuvent être synthétisées sur matrices ADN bicaténaire, encoché avec l'ADNse I, par un **mécanisme de réparation par l'ADN polymérase I de *E.coli*.** Cette enzyme exhibe les activités 5'–3' exonucléase, 5'–3' polymérase et 3'–5' exonucléase. L'ADN bicaténaire encoché est marqué par excision progressive 5'–3' des nucléotides et leur remplacement 5'–3' par des nucléotides marqués sur la matrice monocaténaire résultante. Le degré d'incorporation est indépendant de la nature du nucléotide employé mais reflète sa concentration, son activité spécifique et aussi le nombre d'encoches introduites dans l'ADN. Dans la méthode classique l'ADNase I et l'ADN polymérase I agissent simultanément, mais une modification dissociant la réaction en deux étapes permet un meilleur contrôle sur le marquage et la longueur des sondes.

Solution

Tampon NT 10X

Tris HCl pH 7.2 ..... 0.5 M

$MgS0_4$ ..... 0.1 M

Dithiothréitol ..... 1 mM

Albumine sérique bovine (ASB) ..... 500 µg/mL

Méthode

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN matrice ..... 1 µg

   Tampon NT 10X ..... 5 µL

   dNTP 1 mM (les 4) ..... 1 µL

   (α-^{32}P) dNTP, 30 TBq/mmol, 100 pmoles ..... 12 MBq

   H_2O bidistillée à ..... 44 µL

   ADNase I (0.1 µg/mL de tampon NT contenant du glycérol 50%) ..... 0.5 µL

   ADN polymérase I ..... 5 U

2. Incuber 60 min à 16°C. Eviter les températures d'incubation supérieures qui favorisent la synthèse non désirée de copies complémentaires aux brins nouvellement synthétisés. Arrêter la réaction avec 1 µL d'EDTA 0.5 M.

3. Inactiver la ADNase et l'ADN polymérase 5 min à 70°C. Isoler la sonde par chromatographie sur colonne de Sephadex G–50.

2.3.4. Système multiprime

Ce système de radiomarquage de l'ADN est une synthèse catalysée par le fragment de Klenow lequel est généré par l'hydrolyse à la subtilisine de l'ADN polymérase I de *E.coli*. Le fragment de Klenow conserve l'activité polymérase et l'activité 3'–5' exonucléase de l'ADN polymérase I, mais pas l'activité 5'–3' exonucléase. La synthèse est amorcée avec des hexanucléotides aléatoires 3' hydroxyl terminaux préparés par digestion à la déoxyribonucléase pancréatique de l'ADN de thymus de veau. Ces amorces sont disponibles commercialement comme éléments de trousses de synthèse de sondes radioactives. Des sondes de 800 nucléotides en moyenne peuvent être obtenues ayant une activité spécifique excédant 10^9 dpm/µg à partir de moins de 0.1 µg d'ADN matrice.

Solutions

Réactif A

Tris HCl pH 8 ..... 0.25 M

$MgCl_2$ ..... 25 mM

ß–mercaptoéthanol ..... 50 mM

dATP, dGTP, dTTP
chacun ..... 100 mM

Réactif B

Tris HCl pH 7.5 ..... 1 mM

EDTA ..... 1 mM

Hexa-désoxy-
nucléotides ..... 90 unités A_{260}/mL

Facteur de conversion:
ADN (µg/mL) = 43 (A_{260} – A_{300})

Mélange réactif:

HEPES 1 M, pH 6.6 ..... 25 vol.

Réactif A ..... 25 vol.

Réactif B ..... 7 vol.

Méthode

1. Dénaturer l'acide nucléique matrice (2.5 µL à 25 µg/mL dans un tube capillaire scellé) pendant 2 min dans l'eau bouillante, puis plonger le capillaire dans un bain de glace.

2. Placer dans un microtube, sur la glace:

   ADN matrice (63 ng) ..... 2.5 µL

   Mélange réactif ..... 11.4 µL

   Albumine sérique bovine
   (10 mg/mL) ..... 1 µL

   [α-^{32}P] dCTP
   100 TBq/mmol. ..... 2 MBq

   Fragment de Klenow ..... 2.5 U

   H_2O bidistillée ..... 25 µL

3. Incuber la réaction pendant 2 h à la température ambiante. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol de la sonde d'ADN selon les méthodes standards.

2.3.5. Synthèse de sondes d'ADN sur matrices synthétiques

L'étude de variations alléliques requiert de courtes sondes hautement radioactives et très spécifiques. De telles sondes ont été préparées par Hellman et Petterson (1987) en employant une réaction d'addition avec le fragment de Klenow et deux

oligonucléotides synthétiques partiellement complémentaires. L'exemple traite des gènes de chaînes lourdes d'IgA humaines dans lesquelles on obtient une sonde de 28 pb à partir d'un octodécadésoxynucléotide et d'un hexadécadéoxynucléotide complémentaires pour les huit nucléotides 3' terminaux.

Solution

Tampon 10X

Tris HCl pH 7.5 ..... 0.1 M

$MgCl_2$ ..... 0.1 M

NaCl ..... 0.6 M

Albumine sérique bovine ..... 500 µg/mL

Méthode

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   Oligonucléotides partiellement complémentaires, chacun ..... 0.5 pmole

   [$^{\alpha-32}$P] dNTP, 100 TBq/mmol, 2.5 pmoles pour chaque position à combler, 45 pmoles au total ..... 4.5 MBq

   Tampon 10X ..... 5 µL

   Fragment de Klenow ..... 4 U

   H_2O bidistillée à ..... 50 µL

2. Incuber la réaction 30 min à 16°C. Ajouter 20 U de fragment de Klenow et incuber 30 min additionnelles à 25°C. Faire l'extraction au phénol en présence de SDS 0.5%. Chromatographier la phase aqueuse sur colonne de Sephadex G–50. Ajouter 50 µg d'ARNt porteur et faire une précipitation à l'éthanol dans les conditions habituelles.

2.3.6. Synthèse de sondes d'ADN avec le système M13

Le système M13 est un système de synthèse d'ADNc spécifiques catalysé par le fragment Klenow pour fins de séquençage ou de préparation de sondes d'hybridation. Des vecteurs de clonage ont été construits à partir de l'ADN circulaire monocaténaire du bactériophage M13. La forme réplicative (FR) bicaténaire de M13 peut être recombinée *in vitro* avec des fragments de restriction exogènes pour ensuite être répliquée en phages ADN monocaténaires recombinants. Des sous-clones M13 (e.g. M13 mp 7, M13 mp 8) ont été construits avec une partie du gène lac de *E.coli* intégrant un multisite de restriction. La séquence située à cette région en 3' constitue la matrice pour l'amorce universelle de séquençage permettant la synthèse spécifique du brin complémentaire (–) à l'ADN exogène introduit. D'autres sous-clones (dont M13 mp 9) ont été construits avec le multisite de restriction dans l'orientation inverse permettant avec la même amorce de séquencer par l'autre extrémité. Une seconde amorce, l'amorce universelle de séquençage inverse, existe dans ce système, qui a la propriété de s'hybrider au brin complémentaire (–), après dénaturation thermique de l'ADN–lac de M13–FR. Cette amorce initie la synthèse à l'extrémité 5' du brin (+) de l'ADN intégré. L'emploi des deux amorces universelles permet donc le séquençage par les deux extrémités d'un fragment d'ADN avec un seul vecteur M13.

Pour la préparation de sondes spécifiques M13, on a développé une amorce universelle d'hybridation (complémentaire pour la région située en 5' du

multisite de restriction du vecteur monocaténaire M13 mp 7) qui initie la synthèse en présence de précurseurs radioactifs, du brin complémentaire (–) au vecteur en aval de l'insertion. Les conditions sont ajustées telles que la synthèse du brin complémentaire demeure incomplète, laissant à l'état monocaténaire le segment d'ADN intégré. Ainsi, une sonde circulaire, partiellement bicaténaire et hautement radioactive est obtenue qui est spécifique pour la séquence intégrée.

Solutions

Tampon H

Tris HCl pH 7.9 ..... 1000 mM

NaCl ..... 600 mM

$MgCl_2$ ..... 66 mM

Méthode

1. Placer dans un microtube:

   Amorce d'hybridation synthétique M13 (2 ng) ..... 1 µL

   Vecteur M13 recombinant monocaténaire (50 ng) ..... 1 µL

   Tampon H ..... 1.5 µL

   Dithiothréitol 0.1 M ..... 1 µL

   H_2O bidistillée ..... 4.5 µL

2. Incuber 15 min à 65°C puis équilibrer à la température ambiante.

3. Ajouter:

   [α^{-32}P] dATP 100 TBq/mmol ..... 400 MBq

   dCTP, dGTP, dTTP 500 µM chacun ..... 1 µL

   Fragment de Klenow (500 U/mL) ..... 1 µL

4. Incuber 60 min à la température ambiante.

5. Arrêter la réaction avec 1 µL d'EDTA 0.25 M pH 8.3. Conserver la sonde sur la glace.

2.3.7. Marquages terminaux

Les méthodes de marquage précédentes comportaient toutes la synthèse *de novo*, sur matrices, en présence de précurseurs radioactifs, de copies d'acides nucléiques marquées de façon relativement uniforme. Pour marquer des acides nucléiques disponibles *a priori*, il existe une sélection d'enzymes permettant l'addition spécifique de nucléotides ou d'analogues radio-actifs à leurs extrémités 3' ou 5'. L'activité spécifique atteinte est inférieure à celle obtenue par les méthodes de marquage uniforme. Bien que les acides nucléiques ainsi marqués puissent être employés comme sondes d'hybridation, leur champ d'application principal est le séquençage de gènes par clivage chimique spécifique.

2.3.7.1. T4 polynucléotide kinase

La T4 polynucléotide kinase catalyse le transfert du γ-phosphate de l'ATP à l'hydroxyl 5' terminal de l'ARN, de l'ADN monocaténaire ou de l'ADN bicaténaire avec l'extrémité 5' saillante.

Solutions

Tampon phosphatase

Tris HCl pH 8 ..... 50 mM

EDTA ..... 5 mM

Tampon kinase 10X

Tris HCl pH 8 ..... 50 mM

$MgCl_2$ ..... 0.1 M

Dithiothréitol ..... 50 mM

Spermidine ..... 1 mM

EDTA ..... 1 mM

Méthode

1. Déphosphorylation (s'il y a lieu). Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN ou ARN, extrémités 5' ..... 100 pmoles

   Tampon phosphatase ..... 150 µL

   Phosphatase alcaline intestinale de veau ..... 4-8 U

2. Incuber pendant 1 h à 37°C. Inactiver la phosphatase pendant 10 min à 65°C. Faire 5 extractions au phénol: chloroforme suivies d'une précipitation à l'éthanol.

3. Pour le marquage placer dans un microtube sur la glace:

   ADN ou ARN déphosphorylé extrémité 5' ..... 50 pmoles

   (γ^{-32}) ATP 100 TBq/mmol 50 pmoles ..... 6 MBq

   Tampon kinase 10X ..... 10 µL

   T4 polynucléotide kinase ..... 10-20 U

   H_2O bidistillée à ..... 50 µL

4. Incuber pendant 30 min à 37°C. Arrêter la réaction avec 2 µL d'EDTA 0.5 M. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol.

2.3.7.2. Terminale transférase

La désoxynucléotidyl 3' terminale transférase du thymus de veau est employée pour marquer les fragments d'ADN mono ou bicaténaires aux extrémités 3'. L'enzyme accepte les précurseurs de nature ribo ou désoxyribonucléotidiques. L'ADN monocaténaire est la matrice normale, mais en présence de cobalt substitué au magnésium en temps que cofacteur, l'enzyme accepte aussi les ADN bicaténaires. La terminale transférase additionne successivement les ribonucléotides à l'extrémité 3' d'un fragment d'ADN. Une hydrolyse alcaline subséquente du brin ribonucléotidique laisse deux groupes phosphates–^{32}P, soit le premier (α^{-32}P) ribonucléotide greffé et le groupement phosphate–^{32}P provenant du second. Alternativement, l'emploi d'un analogue 3' déoxy, qui interrompt la synthèse, la 3'–désoxyadénosine–5'–triphosphate (cordycépin–5' triphosphate), permet d'obtenir un produit mono-additionné en 3' fréquemment employé pour le séquençage.

Solution

Tampon cacodylate

Cacodylate de sodium pH 7.6 ..... 1 M

Tris ..... 0.25 M

Dithiothréitol ..... 2 mM

Méthode

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN, extrémités 3' 10 pmoles ..... 15 µL

[α^{-32}P] cordycépin-5'–triphosphate, 200–300 TBq mmol., 20 pmoles, 6 MBq ..... 10 µL

$CoCl_2$ 10 mM ..... 3.5 µL

Tampon cacodylate ..... 3.5 µL

Terminal transférase (20 U/mL) ..... 2 µL

2. Incuber pendant 60 min à 37°C. Ajouter 215 µL d'eau bidistillée, 25 µL d'acétate de sodium 3 M et 750 µL d'éthanol 96%. Incuber pendant 10 min à –70°C ou 30 min à –20°C. Répéter la précipitation à l'éthanol.

2.3.7.3. Fragment de Klenow

Le fragment de Klenow peut être employé pour marquer les extrémités 3' en retrait de fragments bicaténaires d'ADN. Le choix du désoxynucléotide radioactif à employer est dicté par la séquence de l'extrémité 5' saillante. Les fragments *EcoR* I sont habituellement marqués au [α^{-32}P] dATP tandis que les fragments *BamH* I sont marqués au [α^{-32}P] dGTP. Toutefois on peut utiliser un autre désoxynucléotide radioactif, s'il est complémentaire à une des bases de l'extrémité 5' saillante, à condition que les désoxynucléotides le précédant dans la séquence soient inclus dans la réaction. Le cas échéant, il n'est pas nécessaire d'enlever ou d'inactiver les enzymes de restriction ou de procéder à un échange de tampon avant le marquage.

Solutions

Tampon polymérase 10 X

Tris HCl pH 7.6 ..... 0.2 M

$MgCl_2$ ..... 100 mM

β–mercaptoéthanol ..... 15 mM

Dithiothréitol ..... 25 mM

Méthode

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN ..... 1 µg

   Tampon polymérase 10X ..... 2 µL

   H_2O bidistillée à ..... 19 µL

2. Cliver avec une enzyme de restriction, puis ajouter:

   dNTP 2 mM (lorsque nécessaire) ..... 1 µL

   [α^{-32}P] dNTP (selon l'enzyme de restriction), 2 pmoles ..... 75 KBq

   Fragment de Klenow ..... 1 U

   H_2O bidistillée à ..... 25 µL

3. Incuber pendant 30 min à la température ambiante. Arrêter la réaction avec 1 µL d'EDTA 0.5 M. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol selon les méthodes standards.

2.3.7.4. ADN polymérase de T4

L'ADN polymérase du bactériophage T4 possède, comme le fragment de Klenow, une activité polymérase et une activité 3'–5' exonucléase. Cette dernière, toutefois, est 200 fois plus grande que celle du fragment de Klenow. L'enzyme marque l'extrémité 3' d'ADN bicaténaires par réaction d'addition avec les extrémités 3' en retrait et par réaction d'échange avec les autres types d'extrémités. Pour la réaction d'échange, un seul dNTP est fourni.

Les nucléotides sont successivement clivés de l'extrémité 3' de l'ADN bicaténaire grâce à l'activité exonucléase de l'enzyme jusqu'à ce que soit exposé la base complémentaire au [α-^{32}P] dNTP inclus. La base est ensuite continuellement additionnée, puis échangée jusqu'à l'interruption de la réaction. Dans la réaction d'addition la présence des quatre dNTP masque l'activité 3'–5' exonucléase au profit de l'activité polymérase de l'enzyme. Le produit est un fragment bicaténaire complété avec un ou quelques nucléotides marqués près de l'extrémité 3'. Le tampon employé avec l'ADN polymérase de T4 n'est pas compatible avec toutes les enzymes de restriction, de sorte qu'il est parfois nécessaire d'extraire les fragments de restriction au phénol: chloroforme et de les reprendre dans le tampon TE (Tris–HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.9) avant de procéder au marquage.

Solutions

Tampon polymérase T4, 10X

Tris acétate pH 7.9 ..... 0.33 M

Acétate de potassium ..... 0.66 M

Acétate de magnésium ..... 0.10 M

Dithiothréitol ..... 5 mM

Albumine sérique bovine ..... 1 mg/mL

Méthode

1. Avec les enzymes de restriction qui sont compatibles avec le tampon polymérase, placer dans un microtube:

   ADN ..... 0.5-2.0 µg

   Tampon polymérase 10X ..... 2 µL

   H_2O bidistillée à ..... 19 µL

2. Traiter avec l'enzyme de restriction, puis ajouter:

   dNTP 2 mM (chacun de trois) .... 1 µL

   [α-^{32}P] dNTP (le quatrième), 2 pmoles ..... 75 KBq

   ADN polymérase de T4 (2.5 U/µl) ..... 1 µL

3. Incuber pendant 5 min à 37°C, puis ajouter:

   dNTP 1 mM (le quatrième) ..... 1 µL

4. Incuber pendant 10 min à 37°C. Arrêter la réaction en incubant pendant 5 min à 70°C. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol selon les méthodes standards.

2.3.7.5. ARN ligase de T4

L'ARN ligase de T4 catalyse la formation ATP–dépendante d'un lien phosphodiester internucléotidique entre un phosphate 5' terminal (donneur) et un hydroxyl 3' terminal d'ARN (accepteur). Si le donneur est un nucléoside 3', [5'-^{32}P]–biphosphate et l'accepteur un ARN 3'–déphosphorylé, le produit sera un ARN, allongé d'un nucléoside 3' phosphate comportant un phosphate–^{32}P dans la dernière liaison internucléotidique.

Solutions

Tampon ligase

HEPES pH 8.3 ..... 75 mM

ATP ..... 7.5 mM

$MgCl_2$ .....15 mM

Dithiothréitol .....5 mM

Diméthylsulfoxyde .....15% (v/v)

Glycérol .....23% (v/v)

Méthode

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ARN 3'–0H .....1 µg

   Tampon ligase .....20 µL

   ARN ligase de T4 .....6 U

   [5'–^{32}P] pCp, 75 TBq/mmol, 50 pmoles .....4 MBq

   H_2O bidistillée à .....30 µL

2. Incuber 16 h à 4°C. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol selon les méthodes standards.

2.4. RADIO-MARQUAGE CHIMIQUE

Les méthodes chimiques sont peu utilisées pour le radiomarquage des acides nucléiques. Les précurseurs radioactifs chimiquement synthétisés employés dans les méthodes enzymatiques déjà décrites sont disponibles dans le commerce. Nous nous abstenons de décrire la synthèse des nucléotides [α-^{32}P] phosphorylés et des nucléotides [5'–^{35}S] phosphorothioate. Les nucléotides [^{125}I] iodurés, par contre, ne sont pas couramment disponibles commercialement. Les sondes radioiodurées ont néanmoins certaines applications, dont les hybridations *in situ* et sur membranes. Bien que l'on puisse préférer les sondes au tritium ou au soufre–35 qui donnent moins de bruit de fond, pour certaines épreuves de routine, la radioiodation est une méthode simple qui s'adapte à la production en masse de sondes ayant une demi-vie acceptable de 60 jours.

2.4.1 Radio-iodation directe

La méthode d'iodation directe implique la 5' iodation de l'anneau pyrimidine de la cytidine à pH 5 en présence de l'agent oxydant, le chlorure de thallium. Les ADN monocaténaires étant plus susceptibles à l'iodation, les ADN bicaténaires doivent être dénaturés avant le marquage. Certains contaminants, dont les contaminants macromoléculaires qui peuvent compétitionner dans la réaction, les agents réducteurs et les agents chélatants, interfèrent avec l'iodation. L'emploi de températures élevées, d'agents oxydants, d'agents réducteurs et de radioactivité élevée risquent théoriquement d'entraîner une certaine dégradation des sondes. Néanmoins, l'iodation directe donne généralement des sondes fonctionnelles.

Méthode

1. **ADN bicaténaire**:

   Dénaturer l'ADN bicaténaire, 1 mg/mL d'eau pendant 10 min dans l'eau bouillante, puis équilibrer dans un bain de glace. Ajouter un volume de tampon acétate 0.02 M pH 5. L'iodation se fait en présence de tampon acétate de sodium 0.01 M pH 5.

   ARN et ADN monocaténaires:

   Dissoudre les acides nucléiques à 0.5 mg/mL dans un tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 5. L'iodation se fait dans ce tampon.

2. Placer dans un microtube sur la glace:

   Acide nucléique (0.5 mg/mL) ..... 4 µL

   KI 2.5 mM ..... 10 µL

   [^{125}I] NaI ..... 40 MBq

   $TlCl_3$ 15 mM (solution fraîche dans le tampon acétate de sodium 0.01 ou 0.1 M, pH 5) ..... 10 µL

   Tampon acétate de sodium 0.01 ou 0.1 M, pH 5 à ..... 100 µL

3. Incuber pendant 15 min à 60°C, puis équilibrer dans un bain de glace. Arrêter la réaction avec 25 µL de l'agent réducteur, le β–mercaptoéthanol 30 mM.

4. Après 2 min, dissocier les produits intermédiaires instables avec 50 µL de solution d'acétate d'ammonium 1 M–hydroxyde d'ammonium 0.5 M (pH 9) en incubant pendant 15 min à 60°C. Isoler l'acide nucléique marqué par chromatographie sur Sephadex G–50 et par précipitation à l'éthanol.

2.4.2. Radio-iodation indirecte

La méthode indirecte comprend la synthèse de [5–^{125}] I–dCTP ou [5–^{125}] I–CTP suivie de son incorporation enzymatique dans l'ADN ou l'ARN respectivement. La [5–^{125} I] Iodocytidine 3', 5' biphosphate (pICp) peut également être synthétisée et être employée comme donneur avec l'ARN ligase de T4. La méthode d'iodation est essentiellement la même mais elle évite l'exposition des acides nucléiques aux conditions plus dénaturantes de la méthode directe.

Méthode

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   dCTP ou CTP 10 mM ..... 4 µL

   [^{125}I] NaI ..... 140 MBq

   $TlCl_3$ 20 mM (solution fraîche dans le tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 5 ..... 0.8 µL

   Tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 5 à ..... 80 µL

2. Incuber la réaction pendant 15 min à 60°C, puis équilibrer dans un bain de glace.

3. Arrêter la réaction avec 20 µL de sulfite de sodium 80 mM. Après 2 min, dissocier les produits intermédiaires instables avec 100 µL de solution d'acétate d'ammonium 1M–hydroxyde d'ammonium 0.5 M (pH 9) en incubant pendant 15 min à 40°C.

4. Diluer le mélange de réaction à 1 mL avec de l'eau et l'appliquer sur une colonne de DE–52 cellulose (Whatman) de 0.9 x 22 cm préalablement lavée avec 50 mL de tampon bicarbonate de triéthylammonium (BCTEA) 1 M, pH 8, puis équilibrée avec BCTEA 10 mM pH 8.

5. La charge appliquée, rincer la colonne avec 10 mL de tampon BCTEA 10 mM et éluer à 0.8 mL/min. avec 1 L de gradient linéaire de BCTEA, pH 8, variant de 0.01 M à 0.5 M.

6. Grouper les fractions contenant les triphosphates marqués et assécher en évaporant sous vide à 40°C. Reprendre le produit final dans 0.5 mL d'eau.

3. PROTÉINES

Le radiomarquage métabolique des protéines simples implique l'incorporation *in vivo* ou *in vitro* de leurs acides aminés constituants, dont au moins un qui comporte une ou des substitutions de tritium ou de carbone–14 en diverses positions ou le cas échéant, de soufre–35 dans la méthionine ou la cystéine. Les acides aminés nécessaires à cette fin sont disponibles commercialement. Les méthodes métaboliques permettent l'identification de produits de traduction pour fin d'étude, entre autres, de l'expression génétique et son contrôle ou de la localisation et l'assemblage de diverses structures cellulaires ou virales.

Le radiomarquage enzymatique ou chimique, d'autre part, s'applique aux protéines disponibles *a priori* et permet, lors de méthodes expérimentales subséquentes, de les suivre spécifiquement même à l'état de traces. Ces marquages se font le plus souvent avec les radio-isotopes de l'iode. Les méthodes de radio-iodation se subdivisent en méthodes directes et indirectes ou de conjugaisons. Dans les méthodes directes, l'iodure cationique oxydé est directement mono ou di-substitué dans l'anneau phénolique de la tyrosine en position ortho au groupe hydroxyl. Dans des conditions plus alcalines que celles habituellement employées, l'histidine et la tryptophane sont également iodurés. Dans les méthodes indirectes, des réactifs iodurés sont conjugués aux protéines à divers sites de condensation, dans des conditions généralement moins dénaturantes que les conditions d'iodation directe.

Les méthodes directes sont simples et efficaces. Toutefois, elles ne peuvent êtres utilisées qu'avec des peptides contenant les résidus d'acides aminés iodurables: tyrosine, histidine, et/ou tryptophane. De plus les agents oxydants et réducteurs employés peuvent théoriquement altérer la structure tertiaire et l'activité biologique de certaines protéines, car le tryptophane, la méthionine et la cystéine sont particulièrement sensibles à l'oxydation et les ponts disulfures à la réduction. En pratique, la concentration de ces agents et la durée d'incubation est telle qu'il y a peu de dénaturation. Enfin, certaines protéines, riches en groupes thiols réducteurs ne se prêtent pas à l'iodation directe parce que leur capacité réductrice inhérente inhibe l'indispensable oxydation de l'iodure.

Les méthodes de radio-iodation par conjugaison sont plus douces que les méthodes directes du point de vue chimique et radiologique. Des réactifs ayant une activité spécifique en excès de 75 TBq/mmol sont disponibles commercialement pour cet usage. Il est également possible de réaliser soi-même en laboratoire le marquage du réactif de conjugaison par une des méthodes directes. Avec certains peptides dépourvus d'acides aminés iodurables, une stratégie possible consiste à y introduire le conjugué non-marqué de manière à constituer un stock de matériel stable et homogène pour marquage par méthode directe au besoin. Notons, enfin, que des réactifs de conjugaison sont également disponibles pour l'introduction de radio-isotopes autres que l'iode dans les protéines dont, par exemple, l'ester de N–hydroxysuccinimidyl t–butoxycarbonyl-L–[^{35}S] méthionine, le dicyclohexyl [^{14}C] carbodiimide et le N–Succinimidyl [2, 3–^{3}H] propionate.

L'iode est toujours un marqueur externe des protéines de sorte que leur structure s'en trouve inévitablement modifiée. Indépendamment de la méthode de marquage employée, un empêchement stérique dans ou près d'un site actif, d'un récepteur ou d'un déterminant quelcon-

que peut entraîner une modification dans les propriétés biologiques et/ou biophysiques d'une protéine marquée. Dans cette éventualité, il est généralement possible de sélectionner un autre réactif de conjugaison ayant un site de réaction agissant à des sites différents sur la protéine et permettant de conserver intactes les propriétés à l'étude.

Certaines des méthodes d'iodation des protéines sont à caractère vectoriel puisqu'elles marquent préférentiellement les tyrosines stériquement accessibles à la surface de membranes ou de structures tridimensionelles, le cas échéant. Les méthodes en phase solide (Enzymobeads, Iodobeads, Iodo–Gen), à la lactoperoxidase et à l'acide iodosulfanilique sont parmi celles-ci. Toutefois, elles ne sont pas réservées exclusivement à cette fin.

Dansd les méthodes de radio-iodation, les protéines sont exposées à la radiolyse par contact avec l'iode radioactif aussi bien en cours de marquage que pendant le stockage subséquent. Elles sont graduellement hydrolysées en partie par interaction directe avec les rayons gamma, mais surtout par l'action des produits de radiolyse de l'eau. D'autre part, les protéines sont exposées à la dénaturation suite à leur dilution excessive en cours de marquage ou, en l'absence de précautions appropriées, par contact avec la solution alcaline d'[^{125}I] iodure de sodium dissous dans l'hydroxyde de sodium.

Les protéines iodurées tendent à se polymériser de même qu'à adhérer aux surfaces de verre et de plastique. Il y a lieu de prendre certaines précautions pour contrôler ces problèmes. Les protéines devraient êtres marquées à la plus faible radioactivité compatible avec la détection efficace dans l'application envisagée. Pendant le marquage, la radioactivité et sa durée de contact avec la protéine devraient être les plus réduites possible. La solution d'iodure–125 devrait être tamponnée avant usage. Une solution de protéine porteuse devrait être ajoutée après l'arrêt de la réaction d'iodation de façon à absorber les radiations, neutraliser les produits de radiolyse de l'eau, stabiliser la protéine iodurée diluée et bloquer son adhésion au verre et au plastique. Un iodure de sodium ou de potassium non-radioactif devrait également être ajouté à l'étape d'isolement de la protéine marquée pour déplacer le radio-iodure faiblement lié à la protéine par des liens électrostatiques.

Les protéines marquées sont généralement isolées par chromatographie sur une colonne de Sephadex G–25. Le choix du tampon d'élution n'est pas critique mais doit préférablement contenir une protéine et un iodure porteur. Le volume de la colonne devrait être au moins dix fois plus grand que le volume de l'échantillon à traiter. Le premier pic radioactif élué contient les protéines marquées et le second contient l'iodure libre.

Le degré d'incorporation d'iode radioactif dans la protéine peut être évalué à partir des données recueillies à l'étape de filtration sur gel. Sachant que l'iodure libre ne s'adsorbe pas aux surfaces de verre et de plastique il s'en suit que les pertes de radioactivité sont attribuables à l'adsorption de protéines marquées. Si une quantité précise de radioactivité est utilisée pour le marquage, la quantité incorporée se calcule en soustrayant la radioactivité du pic d'iodure libre de la radioactivité initiale. Connaissant la masse de protéine employée, on peut également calculer l'activité spécifique de la protéine marquée. Enfin, le rendement en protéines marquées est le rapport de la radioactivité comptée dans le pic de protéines sur la radioactivité incorporée selon les calculs précédents.

3.1. MARQUAGE *IN VIVO*

Le radiomarquage métabolique de protéines virales permet l'étude de la localisation, la structure et l'assemblage des constituants viraux en cour d'infection. Des techniques d'isolement de cellules et de sous-fractions cellulaires en combinaison avec des méthodes d'électrophorèse en deux dimensions en gels de polyacrylamide permettent la mise en évidence de protéines d'origine virale ou cellulaire apparaissant en cour d'infection. Divers précurseurs radioactifs peuvent êtres employés dont les acides aminés marqués au tritium, carbone–14, ou les acides aminés sulfurés marqués au soufre–35. Les glycoprotéines peuvent par surcroît être marquées avec des monosaccharides radio-actifs et les phosphoprotéines avec le phosphore–32 inorganique (Anderson 1983). La [^{35}S]–méthionine est l'acide aminé radioactif le plus utilisé pour le marquage métabolique. Nous présentons à titre d'exemple plus détaillé les conditions expérimentales pour le marquage *in vivo* d'un antigène tumoral de SV40 de nature phosphoprotéique. La localisation subcellulaire de l'antigène tumoral (T–ag) fut étudiée dans les lignées de cellules transformées de hamster (H–50) et de souris (VLM) de même que dans les cellules normales de reins de singes (TC–7) infectées par SV40: en solubilisant à partir de fractions nucléaires, d'une part, et de membranes cellulaires, d'autre part, les protéines marquées avec [^{35}S] méthionine ou [^{32}P] inorganique, en les immunoprécipitant avec un sérum anti–(T–ag) puis en les analysant par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

Méthode

1. Effectuer les marquages avec la [^{35}S] méthionine ou avec le [^{32}P] inorganique sur des cultures en bouteille (1–2 x 10^8 cellules/ bouteille) soit de cellules TC–7, 48 h post-infection avec SV40 ou de cellules H–50 ou VLM transformées par SV40, 48 h post-ensemencement.

2a. **Incorporation de [^{35}S] méthionine**

Incuber les cellules pendant 2 h à 37°C dans le milieu minimal essentiel de Eagle (MEM, base de Eagle) sans méthionine et enrichi de 2% de sérum de fœtus de veau (SFV) dialysé. Marquer les cellules en incubant pendant 2 h en présence de 5 mL de MEM sans méthionine enrichi de 2% de SFV dialysé contenant 10 MBq de [^{35}S] méthionine.

2b. **Incorporation de [^{32}P] inorganique**

Incuber les cellules pendant 16 h à 37°C dans le MEM sans phosphate enrichi de 5% de sérum foétal bovin dialysé. Ensuite incuber les cellules pendant 2.5 h dans 10 mL de MEM sans phosphate enrichi de 5% de SFV dialysé contenant 100 MBq de [^{32}P] inorganique.

3.2. TRADUCTION *IN VITRO*

Divers systèmes acellulaires prokaryotes et eukaryotes permettent la traduction *in vitro* avec incorporation de précurseurs marqués. Un système bactérien de transcription-traduction couplé, préparé à partir d'*E. coli*, permet la synthèse de protéines résultant de l'expression d'ADN cloné. Des systèmes eucaryotes à base de réticulocytes de lapin ou de germe de blé permettent la traduction d'ARN messager ou tout autre ARN–poly(A).

Plusieurs protéines pré-sécrétoires se terminent à l'extrémité N–terminale par une séquence de 15 à 30 acides aminés à caractère hydrophobe désignée peptide signal. Ces peptides peuvent être scindés par les peptidases associées aux membranes microsomales. Cette opération est concomitante en présence de celles-ci mais peut être réalisée à posteriori en présence d'extraits de ces membranes au détergent. L'hydrolyse du peptide signal peut être mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS par une augmentation de mobilité. Des trousses de traduction de même que des préparations de membranes microsomales avec mode d'emploi sont disponibles commercialement. À titre indicatif nous présentons néanmoins la préparation et l'emploi d'un système acellulaire à base de germe de blé avec inclusion de membranes microsomales.

Méthode

Préparation d'un extrait de germe de blé–S23

1. Broyer dans un mortier froid 1.5 g de germes de blé frais dans 10 mL d'une solution $Mg(CH_3COO)_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 2 mM et KCl 90 mM.

2. Centrifuger l'extrait pendant 10 min à 23 000 x g et prélever le surnageant dégagé de la couche lipidique et du culot.

3. Tamponner l'extrait à 20 mM Tris–acétate, pH 7.6 et ajuster la concentration d'acétate de magnésium à 2 mM puis centrifuger à nouveau.

4. Equilibrer le surnageant sur une colonne de Sephadex G–25 1.5 x 25 cm contre une solution contenant:

   Tris–acétate pH 7.6 ..... 1 mM

   KCl ..... 50 mM

   $Mg(CH_3COO)_2$ ..... 1 mM

   β–mercaptoéthanol ..... 4 mM

5. Combiner les fractions turbides et centrifuger pendant 10 min à 23 000 x *g*. Conserver l'extrait S23 en aliquots à –80°C jusqu'à usage.

Préparation de membranes microsomales

6. Centrifuger le surnageant post-mitochondrie (10 000 x *g* 10 min) de tissus pancréatiques de chien à 180 000 x *g* pendant 1 h.

7. Homogénéiser le culot de membranes microsomales dans un tampon triéthanolamine–HCl 50 mM pH 7.5 , et ajuster la concentration de l'extrait à 50 unités A_{280}/mL.

8. Ajouter un volume égal du même tampon contenant de l'EDTA 20 mM. **Centrifuger pendant 1 h à 100 000 x *g* sur un coussin de saccharose 0.5 M** dans un tampon triéthanolamine–HCl 50 mM pH 7.5, contenant 50 mM de KCl.

9. Resuspendre le culot à une concentration finale de 50 unités A_{280}/mL dans un tampon triéthanolamine–HCl 50 mM pH 7.5, contenant 50 mM de KCl et 2 mM de $MgCl_2$

10. Congeler les microsomes en aliquots dans l'azote liquide et conserver les à –80°C jusqu'à usage.

Traduction

11. Placer dans un microtube à 0–4°C, dans un volume de 100 µL, les éléments suivants:

Extrait de germe
de blé S23 ..... 20-40 µL

HEPES pH 7.5 à 20°C ..... 2 µL

KCl ..... 2 µmoles

CH_3COOH ..... 11 µmoles

$(CH_3COO)_2$ Mg ..... 0.2 µmoles

Spermidine HCL, pH 7.5 ..... 8 nmoles

Dithiothréitol ..... 0.2 µmoles

ATP ..... 0.1 µmoles

GTP ..... 0.01 µmoles

Créatine phosphate ..... 0.8 µmoles

Créatine phosphokinase ..... 4 µg

[^{35}S] méthionine,
8 TBq/mmol. ..... 500 KBq

Les 19 autres acides aminés,
chacun ..... 2 nmoles

ARNm ..... 0.1 U A_{250}

Microsomes ..... 4.0 U A_{280}

12. Incuber pendant 90 min à 27°C. Les produits de traduction peuvent êtres précipités avec de l'acide trichloracétique ou spécifiquement par immunoprécipitation et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

3.3. MARQUAGE ENZYMATIQUE *IN VITRO*

3.3.1. Lactoperoxidase

L'oxydation d'iodure et sa substitution dans la tyrosine peut être effectuée enzymatiquement par l'intermédiaire de la lactoperoxidase, en présence de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène. La réaction est initiée par l'addition de peroxide puis est entretenue par additions subséquentes à toutes les 7 minutes. Alternativement, le peroxyde peut être généré en quantités optimales de façon continue à partir de β–D–glucose par la β–D–glucose oxydase. En présence de concentrations optimales d'iodure, la réaction est vectorielle puisque les seuls résidus tyrosines accessibles à la surface tridimensionnelle de protéines, cellules ou virus, pour la formation de complexes enzyme-substrat sont marqués. La méthode est douce et peu dénaturante. Le milieu de réaction doit être exempt d'inhibiteurs enzymatiques ou d'agents réducteurs de type azide ou sulfhydryl respectivement. Dans certaines conditions, la lactoperoxidase est capable d'iodurer l'histidine. Le principal désavantage de cette méthode est que l'iode est inévitablement incorporé aussi bien dans la lactoperoxidase et la β–D–glucose oxydase que dans la protéine cible.

Méthode

A. Par addition de peroxyde d'hydrogène

1. Placer dans une éprouvette en polystyrène les réactifs:

[^{125}I] NaI, 4 GBq/mL ..... 10 µL

Tampon acétate de sodium
0.4 M, pH 5.6 ..... 20 µL

Protéine cible, 200–500 µg/mL
en tampon phosphate de
sodium 0.05 M, pH 7.5 ..... 10 µL

Lactoperoxydase, 2.5 µg/mL en
tampon acétate de sodium
0.1 M, pH 5.6 ..... 10 µL

Peroxyde d'hydrogène, 20
µg/mL fraîchement dilué ..... 10 µL

2. Incuber pendant 7 min à la température ambiante.

3. Ajouter après 7 min deux autres aliquots de 10 µL de peroxyde d'hydrogène.

4. Pour arrêter la réaction, fixer l'iodure avec 0.5 mL de tyrosine (2 mg/mL) en tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5.

5. Après 1 min, ajouter 0.42 mL de tampon contenant 2 mg/mL de NaI et 2 mg/mL de gélatine. Isoler la protéine marquée sur Sephadex G–25 en présence de gélatine 0.1%.

B. Par génération de peroxyde d'hydrogène avec le système glucose-glucose oxydase

1. Placer dans une éprouvette à 4°C:

Suspension de 4–6 x 10^6 cellules dans du PBS contenant 20 mM de β–D–glucose ..... 1 mL

Lactoperoxidase ..... 3-6 mU

Glucose oxydase ..... 4-8 mU

[^{125}I] NaI, 4 GBq/mL ..... 1 µL

2. Sédimenter les cellules par centrifugation à 500 rpm pendant 10 min à 4°C. Reprendre le culot de cellules dans 20 mL de milieu minimal de Eagle (MEM) froid et recentrifuger.

3. Laver les cellules deux autres fois avec 20 mL de MEM froid.

3.3.2. Les Enzymobeads ™ (Bio–Rad)

Les Enzymobeads™ sont des billes hydrophiles de polyacrylamide de 1 µm auxquelles sont liées, de façon covalente, dans un rapport optimal, la lactoperoxidase et la glucose oxydase. La taille et la densité des billes assurent leur maintien en suspension homogène pour la durée de la réaction. Il est possible d'éliminer les problèmes liés à l'auto-iodation des enzymes par l'utilisation des Enzymobeads. La littérature contient plusieurs exemples de leur utilisation comportant des variantes dans les proportions des réactifs employés (Bolton 1986).

Méthode

1. Placer dans une éprouvette:

Protéine cible, 200 µg en tampon phosphate de sodium

0.2 M, pH 7.2 ..... 25 µL

[^{125}I] NaI, 4-15 MBq ..... 10 µL

Enzymobeads™ reconstituées ..... 25 µL

β–D–glucose 1% ..... 20 µL

2. Incuber le milieu pendant 15 min à 0°C. Arrêter la réaction avec 20 µL d'azoture de sodium 25 mM puis ajouter 1 mg/mL d'iodure et 1 mg/mL de gélatine et désaler la protéine marquée sur Sephadex G–25. Les Enzymobeads sont retenus sur la colonne. L'inhibiteur enzymatique, l'azoture de sodium, peut être omis si la protéine porteuse est ajoutée seulement après le désalage sur Sephadex G–25.

3.4. RADIO-MARQUAGE CHIMIQUE

3.4.1. Radio-iodation directe

3.4.1.1. Monochlorure d'iode

La première méthode développée pour la substitution efficace d'iode dans les protéines est la méthode de McFarlane

(McFarlane 1958) employant le monochlorure d'iode. Le degré de substitution dépend de la concentration en monochlorure d'iode et peut être contrôlé précisément. Toutefois, l'incorporation dans les protéines d'iode non radioactif provenant du réactif étant inévitable, l'activité spécifique accessible par cette méthode est inférieure à celle qu'il est possible d'atteindre par les autres méthodes décrites. Le réactif s'avère généralement moins dénaturant que le chloramine–T.

3.4.1.2. Chloramine-T

Le chloramine–T est le plus utilisé des agents oxydants pour l'iodation directe des protéines. Ce sel de sodium de N–monochloro-p–toluène sulfonamide s'hydrolyse lentement en solution aqueuse et libère l'acide hypochloreux qui oxyde l'iodure anionique en iodure cationique.

Méthode

1. Placer dans une éprouvette:

   Protéine cible à 2–5 µg en tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5 ..... 10 µL

   Tampon phosphate de sodium 0.25 M, pH 7.5 ..... 10 µL

   [^{125}I] NaI, 4 GBq/mL ..... 10 µL

   Chloramine–T, 5 µg dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.5 (fraichement préparé) ..... 10 µL

2. Incuber pendant 10 min à la température ambiante, puis arrêter la réaction avec 100 µL d'agent réducteur (4.3 µg de cystéine dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.5).

3. Ajouter 1 mL de la solution de porteurs (tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5 contenant 0.2 mg/mL de KI et 10 mg/mL d'albumine).

4. Désaler sur une colonne de Sephadex G–25.

3.4.1.3. Iodobeads ™ (Pierce)

Les Iodobeads™ sont des billes de polystyrène non-poreuses auxquelles sont liées de façon covalente des molécules de chloramine–T. Aucun agent réducteur n'est requis pour arrêter la réaction puisque les billes peuvent êtres retirées physiquement du milieu de réaction. La réaction d'iodation persiste toutefois pendant quelques minutes après le retrait des billes, compte tenu de l'accumulation d'iode oxydé. Il faut éviter d'ajouter une protéine porteuse avant épuisement de cet iode oxydé.

Méthode

1. Laver les Iodobeads avant usage avec deux aliquotes de 1 mL de PBS et assécher les sur un papier filtre.

2. Placer dans une éprouvette:

   Protéine cible, 100 µg dans du PBS ..... 0.5 mL

   [^{125}I] NaI, 4 GBq/mL ..... 10 µL

   Iodobeads ..... 1 bille

3. Incuber pendant 15 min à la température ambiante. Transférer le mélange sans la bille à une seconde éprouvette. Rincer la première éprouvette et la bille avec 1 mL de PBS.

4. Ajouter 0.5 mole de NaI porteur au mélange de réaction et de rinçage, puis désaler sur une colonne de Sephadex G–25.

3.4.1.4. Iodo–Gen™

Le 1,3,4,6–tetrachloro-3α,6α–diphényl-glycouracile (Iodo–Gen™) est un agent oxydant, virtuellement insoluble dans l'eau, qui peut être déposé sur des parois de verre à partir de solutions organiques. Les couches minces de réactif ainsi obtenues permettent l'iodation en phase solide de protéines. Les tubes de réaction préparés à l'avance peuvent être conservés indéfiniment dans un dessicateur contenant un agent dessicant. Le marquage est efficace dans une variété de tampons entre pH 5.5 et 9, le choix étant dicté par la stabilité de la protéine cible.

Méthode

1. Dissoudre l'Iodo–Gen (100 µg/mL) dans le chloroforme, le chlorure de méthylène ou le diméthyl sulfoxyde.

2. Placer des aliquotes de 100 µL dans des éprouvettes de 12 x 75 mm, puis assécher sous un courant d'azote sec à la température ambiante.

3. Conserver les récipients de réaction dans un dessicateur jusqu'à usage. Des récipients de diverses dimensions peuvent être préparés au besoin.

4. Placer dans le récipient de réaction préalablement rincé avec le tampon:

   Protéine cible, 1 mg/mL .....100 µL

   [^{125}I] NaI, 4 GBq/mL .....5 µL

5. Incuber la réaction pendant 15 min à la température ambiante.

6. Retirer le contenu du récipient de réaction et ajouter 100 µL de tampon contenan NaI 0.5 M et 2% d'albumine.

7. Isoler la protéine marquée sur une colonne de Sephadex G–25.

3.4.2. Radio-marquage indirect

3.4.2.1. Réactif de Bolton–Hunter

Le réactif de Bolton–Hunter, N–succinimidyl 3–(4–hydroxyphényl) propionate (NSHPP), se condense aux protéines par acylation des groupes aminés primaires libres des lysines et acides aminés N–terminaux. Le réactif est disponible commercialement, soit à l'état radioioduré ou pouvant l'être subséquemment en laboratoire. Les albumines qui sont fréquemment employées comme protéines porteuses dans l'isolement de protéines marquées ont une affinité pour les réactifs aromatiques de conjugaison. La gélatine est donc employé à cet effet plutôt que le sérum bovin ou l'albumine sérique bovine en présence de réactifs aromatiques.

Méthode

Préparation de NSHPP

1. Dans un tube conique de 10 mL à bouchon rodé, placer 10 µL de NSHPP, 40 µg/mL de toluène: éthyle acétate (1:1 v/v) et assécher sous un courant d'azote sec.

2. Ajouter promptement sous agitation (le NSHPP étant instable):

   [^{125}I] NaI, 4 GBq/mL .....20 µL

   Chloramine–T, 5 mg/mL en tampon phosphate de sodium 0.25 M, pH 7.5.....10 µL

   Métabisulfite de sodium, 12 mg/mL en tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5.....10 µL

NaI ou KI (200 mg/mL) .....10 µL

Diméthylformamide.....2 µL

Benzène redistillé.....250 µL

3. Mélanger avec un agitateur Vortex pour extraire le [^{125}I] NSHPP dans le benzène. Transférer le benzène dans un second tube conique, puis répéter l'extraction de la phase aqueuse avec deux autres aliquots de 250 µL de benzène.

4. Assécher le mélange des extraits au benzène avec un courant d'azote sec.

5. Concentrer le résidu de réactif ioduré en rinçant les parois du tube avec un minimum de benzène puis, en asséchant de nouveau.

6. Ajouter à 40 MBq de [^{125}I) NSHPP sec, 10 µL de protéine cible dissoute dans un tampon borate 0.1 M, pH 8.5, puis incuber la réaction pendant 30 min à 0°C.

7. Neutraliser la réaction avec 0.5 mL de glycine 0.2 M (un amine primaire) dans le tampon borate.

8. Incuber 5 min additionnelles à 0°C puis ajouter 1 mL de tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5, contenant 2.5 mg de gélatine.

9. Isoler la protéine conjuguée sur Sephadex G–25.

3.4.2.2. Réactif de Wood

Le réactif de Wood, méthyl p–hydroxybenzimidate (MPHBIM) se condense sélectivement sur les groupes ε–amino de la lysine pour former des liens amidine protonés. La méthode a l'avantage de ne pas modifier la charge de la protéine marquée, ce qui n'est pas le cas de la méthode Bolton–Hunter ou même des méthodes d'iodation directes qui modifient la charge des protéines en changeant le pKa du phénol tyrosinique. Le réactif est plus stable en solution aqueuse que le réactif Bolton–Hunter. Il est disponible commercialement non-ioduré ou ioduré.

Méthode

1. Placer dans une éprouvette en polypropylène de 1.5 mL:

   MPHBIM, 73 µg/mL de borate de sodium 0.05 M, pH 8 .....5 µL

   Chloramine–T, 15 mg/mL de tampon phosphate de sodium 0.25 M, pH 7.5.....5 µL

   [^{125}I] NaI, 4 GBq/mL .....10 µL

2. Mélanger pendant 5 sec sur un agitateur Vortex puis ajouter:

   Sodium métabisulfite, 20 mg/mL de diméthylformamide 10% (v/v) .....5 µL

   Benzène redistillé.....250 µL

3. Faire la triple extraction du réactif marqué tel que décrit pour le réactif Bolton-Hunter.

4. Au réactif de conjugaison séché [^{125}I] MPHBIM, ajouter 10 µL de protéine cible 0.5 mg par mL de tampon borate 0.1 M, pH 8.5 puis incuber pendant 24 h à la température ambiante.

5. Arrêter la réaction avec 4 µL de NH_4HCO_3 2 mM.

6. Après 5 min, ajouter 1 mL de tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5, contenant 2.5 mg de gélatine.

7. Isoler la protéine conjuguée sur Sephadex G–25.

3.4.2.3. Acide diiodosulfanilique diazoté

L'acide diiodosulfanilique a une taille et une polarité telles qu'il ne pénètre pas les membranes lipidiques. Il est donc recommandé pour les radiomarquages de surface de cellules et virus. L'acide [^{35}S] sulfanilique a été le premier dérivé de l'acide sulfanilique employé à cette fin. L'emploi à faible concentration et haute activité spécifique du réactif permet la réalisation de marquages sans perte de fonctions membranaires. Le réactif, comme les autres composés di–azotés, se condense aux groupes tyrosines, histidines et lysines des protéines cibles. Il peut être employé au même titre que les autres réactifs de conjugaison pour réaliser le marquage non-vectoriel de protéines solubles. L'acide [^{125}I] di-iodosulfanilique est disponible commercialement.

Méthode

1. Assécher l'acide [^{125}I] diiodosulfanilique, 4 MBq à 60 TBq/mmol en évaporant le solvant n–propanol: eau (1:1, v/v) sous un courant d'azote et reprendre immédiatement dans 10 µL d'eau froide. Le réactif s'autoradiolyse rapidement à l'état sec.

2. Ajouter au réactif dans un bain de glace, 5 µL de nitrite de sodium 50 mM et 5 µL de HCl 0.1 N.

3. Incuber la réaction pendant 5 min à 0°C, puis neutraliser avec 80 µL de tampon phosphate de sodium 0.1 M, pH 7.5.

4. A 5°C, ajouter le réactif diazoté à la suspension cellulaire ($5x10^6$ cellules/mL) préalablement lavée 10 fois au PBS, pH 7.5.

5. Après 15 min d'incubation, centrifuger la suspension 5 min à 500 x *g* et décanter le surnageant.

6. Laver les cellules 6 fois au PBS froid contenant 1% d'albumine.

Certains types de cellules (e.g. érythrocytes) se marquent plus lentement que d'autres. Dans de tels cas la période d'incubation doit être prolongée, et l'hydrolyse du sel diazonium peut devenir appréciable et peut réduire l'incorporation du marqueur. Cet effet peut être contrôlé par l'addition d'acide diiodosulfanilique non radioactif avant la diazotation pour assurer une concentration finale d'acide diiodosulfanilique diazoté de 10^{-4} M pendant le marquage cellulaire.

3.4.2.4. Acide N–hydroxysuccinimidyl-4–azidosalicilique (ANHS–AS)

Ce réactif hétérobifonctionel iodurable est employé dans des méthodes de marquage par affinité pour lier de façon covalente, après photoactivation aux UV longs, divers ligands macromoléculaires. Ainsi l'enzyme, l'anticorps, lectine ou autre récepteur couplé au réactif radioioduré, après s'être lié spécifiquement à son substrat, s'y attache après exposition aux UV longs de manière à former un pont covalent radioactif avec celui-ci.

Méthode

1. Placer dans une éprouvette:

   ANHS–AS
   2 mM dans l'acétone.....100 µL

   [^{125}I] NaI, 20 GBq/mL .....2 µL

Chloramine–T
200 µg dans l'acétone .....20 µL

2. Isoler le réactif marqué par chromatographie en couche mince sur gel de silice G en développant avec benzène: chloroforme: acétate d'éthyl: acide acétique (1:1:1:0.1, v/v).

3. Préparer une solution 100 mM de [^{125}I] ANHS–AS dans le diméthyl sulfoxyde, puis diluer 1:500 avec PBS, pH 7.4.

4. Placer dans une éprouvette:

[^{125}I] ANHS–AS 0.2 mM.....50 µL

Protéine cible,
10 µg dans le PBS, pH 7.4.....50 µL

5. Incuber la réaction pendant 30 min à 25°C, puis isoler la protéine marquée sur Sephadex G–25.

3.4.3. Marquage au tritium

Les protéines tritiées, ayant une longue demi-vie et une grande stabilité radiochimique peuvent s'avérer préférables aux protéines radio-iodurées pour certaines applications. L'acétylation et la méthylation réductrices sont deux méthodes disponibles pour tritier les protéines sur les groupes ε-amino des lysines. Les exemples suivants traitent de la tritiation de la protéine A de *Staphylococcus aureus*.

Méthode

Acétylation

1. Placer dans une éprouvette:

Protéine A, 5 mg en tampon phosphate de sodium 0.3 M, pH 7.2 .....0.45 mL

[^{3}H] anhydride acétique, 10 µmoles à 1 TBq/mmol. .....1 GBq

2. Incuber la réaction pendant 2 h à la température ambiante et isoler la protéine A tritiée sur Sephadex G–25.

Méthylation

3. Placer dans une éprouvette:

Formaldéhyde 3.7% .....0.5 mL

Protéine A, 10 mg en tampon borate, pH 9 .....1.0 mL

[^{3}H] $NaBH_4$, 100 GBq/mL en NaOH 0.1N, 2 TBq/mmol .....0.3 mL

4. Incuber la réaction pendant 30 min à 4°C et isoler la protéine A tritiée sur Sephadex G–25.

3.4.4. Marquage avec les radionucléides métalliques

Un agent chélateur fort, tel que l'acide diéthylène triamine penta-acétique (ADTP), peut être conjugué à la lysine des protéines de sorte qu'un radionucléide métallique peut y être lié. Cette approche est employée principalement avec les anticorps monoclonaux pour usage diagnostique dans les techniques d'imagerie et l'indium–111 est souvent employé. Puisque ces conjugués peuvent être radio-marqués immédiatement avant usage, ils ne subissent ni radiolyse ni désintégration radioactive pendant l'entreposage. De plus, ceux-ci sont plus stables *in vivo* et donnent une meilleure imagerie que les anticorps radioiodurés.

Méthode

1. Dans une éprouvette contenant 0.7 à 0.9 µg d'ADTP solide, placer 20 µL de solution protéine cible 1.5% en tampon bicarbonate de sodium 0.05 M, pH 7.

2. Après 1 min, isoler le conjugué sur une colonne de Sephadex G–25 élué avec HEPES 0.05 M, NaCl 0.15 M contenant 20 mg/mL d'albumine.

3. Chélater le conjugué avec 25-100 KBq d'indium-111/µg de conjugué immédiatement avant usage et désaler sur Sephadex G–25.

4. POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides et les portions oligosaccharidiques de glycoprotéines constituent une troisième famille de macromolécules biologiques dont le radiomarquage trouve des applications en virologie. Le marquage peut s'effectuer *in vivo* par incorporation de monosaccharides radioactifs ou par des méthodes chimiques. L'iodation d'oligosaccharides peut être réalisés en générant des groupes 1–amino-1–déoxyalditols par amination réductrice suivie d'acylation avec le réactif BoltonHunter. La tritiation, d'autre part, est possible par réduction au borohydrure de sodium tritié.

Le développement de multiples techniques immunologiques et de trousses diagnostiques basées sur la technologie des anticorps monoclonaux motive la recherche de méthodes non-dénaturantes pour le marquage des immunoglobulines. Toutes les classes d'immunoglobulines sont des glycoprotéines dont les portions oligosaccharidiques ne sont pas directement impliquées au niveau des sites anticorps de sorte que l'introduction d'un marqueur à ce niveau est moins susceptible d'en affecter l'affinité que le marquage externe d'acides aminés.

Le marquage nécessite la génération de résidus aldéhydiques par oxydation periodique suivie de la condensation d'un marqueur à caractère nucléophile de type amine ou hydrazide. Les conditions de l'oxydation periodique peuvent être ajustées pour être spécifiques au carbone C–7 exocyclique des résidus d'acide sialique, laissant ainsi intact les acides aminés. Une molécule signal radioactive ou chélatante pour les métaux radioactifs peut être conjuguée par le biais d'un résidu aminé aux groupes aldéhydes générés. La base de Schiff résultante est enfin stabilisée par réduction au cyanoborohydrure ou au borohydrure de sodium. Des molécules signal avec le groupe réactif hydrazide ont été employées, mais pas avec un radiomarqueur. Ces derniers auraient l'avantage de réduire le risque de formation fortuite de bases de Schiff inter ou intramoléculaires. De plus, aucune étape de réduction au cyanoborohydrure n'est requise avec les hydrazones formés.

Méthode

Oxydation periodique

1. Placer dans une éprouvette sur la glace:

   Immunoglobulines .....50 mg

   Periodate de sodium 10-30 mM en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6, chlorure de sodium 0.15 M.....2.5 mL

2. Incuber pendant 1 h à l'abri de la lumière, puis désaler sur Sephadex G–25 en éluant avec du PBS.

Radio-ioduration

3. Iodurer la tyrosine du peptide synthétique glycyl-tyrosyl-glycyl-glycyl-arginine avec l'iode–125 par la méthode chloramine–T.

4. Incuber 1000 moles du peptide marqué par mole d'immunoglobulines modifiées, pendant 1 h à la température ambiante.

5. Ajouter le cyanoborohydrure de sodium à 10 mM (concentration finale) et incuber pendant 4 h.

6. Isoler la protéine marquée sur Sephadex G–25.

Radio-marquage à l'indium-111

7. Incuber 1000 moles, soit d'acide glycyl-tyrosyl-lysyl-diéthylène-triamine penta-acétique ou d'acide p–aminoaniline diéthylène-triamine-penta-acétique par mole d'immunoglobulines modifiées pendant 1 h à température ambiante.

8. Effectuer la réduction au cyanoborohydrure de sodium 10 mM et désaler sur Sephadex G–25.

9. Ajouter immédiatement avant usage 100 KBq d'indium–^{111}/µg de conjugué et désaler sur Sephadex G–25.

5. LIPIDES

Les lipides complexes des membranes cellulaires et virales constituent une autre classe de macromolécules biologiques pour laquelle des méthodes de radiomarquage peuvent être utiles. Une sélection de précurseurs marqués au tritium ou au carbone–14 est disponible commercialement pour incorporation *in vivo*. Il est possible, d'autre part, de marquer les lipides à l'iode radioactif par l'intermédiaire de la lactoperoxidase. La méthode permet de marquer les phospholipides, les lipides neutres et les acides gras libres, saturés ou insaturés. A titre d'exemple, on retrouve 32% de l'iode incorporé dans les cellules tumorales lignée–10 par iodation à la lactoperoxydase dans les lipides membranaires. La méthode peut également servir à iodurer les liposomes.

Méthode

1. Placer dans une éprouvette:

   Liposomes (500 µg de lipides)
   ou cellules lavées (5 x 10^6)
   dans le PBS ..... 0.4 mL

   Lactoperoxydase ..... 10 µg

   Glucose oxydase ..... 3 mU

   β–D glucose 25 µM ..... 50 µL

   [^{125}I] NaI, 4 GBq/mL ..... 4 MBq

   PBS à ..... 0.5 mL

2. Incuber la réaction pendant 15 min à la température ambiante, puis laver les cellules ou les liposomes 5 fois dans le PBS.

6. RÉFÉRENCES

Anderson, N.G. 1983. High-resolution protein separation and identification methods applicable to virology. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 104: 197-217.

Bolton, A.E. 1977. *Radioiodination Techniques*. The Radiochemical Center, Amersham, England. Review 18.

Bolton, A.E. 1986. Comparative methods for the radiolabeling of peptides. Meth. Enzymol. 124: 18–29.

Bolton, A.E., et Hunter, W.M. 1973. The labeling of proteins to high specific radiactivities by conjugation to a ^{125} I-containing acylating agent. Biochem. J. 133: 529–538.

Efstratiadis, A., Maniatis, T., Kafatos, F.C., Jeffrey, A., et Vournakis, J.N. 1975. Full length and discrete partial reverse transcripts of globin and chorion mRNAs. Cell 4: 367–378.

Gaastra, W., et Josephsen, J. 1984. Radiolabeling of DNA with the Klenow fragment of DNA polymerase. Meth. Mol. Biol. 2: 263-268.

Huang, E.S., et Pagano, J.S. 1977. Nucleic acid hybridization technology and detection of proviral genomes. Meth. Virol. 6: 457–497.

Langone, J.J. 1980. Radioiodination by use of the Bolton-Hunter and related reagents. Meth. Enzymol. 70: 221–247.

Langone, J.J. 1980. ^{125}I-labeled protein A: Reactivity with lgG and use as a tracer in radioimmunoassays. Meth. Enzymol. 70: 356-375.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., et Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor.

Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A. et Gefter, M.L. 1980. DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3855–3859.

Markwell, M.A.K. 1979. *Radio-iodination of proteins and peptides using Iodo-Gen.* Protein Digest 3: 28–30. (Pierce Chemical Co.)

Markwell, M.A.K. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins: 1. Conditions for the efficient labeling of antiserum. Anal. Biochem. 125: 427-432.

McConahey, P.J., et Dixon, F.G. 1980. Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method. Meth. Enzymol. 70: 210-213.

McFarlane, A.S. 1958. Efficient trace-labeling of proteins with iodine. Nature 182: 53.

Rodwell, J.D., Alvarez, V.L., Lee, C., Lopes, A.D., Goers, J.W.F., King, H.D., Powsner, H.J., et McKearn, T.J. 1986. Site-specific covalent modification of monoclonal antibodies: *In vitro* and *in vivo* evaluations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 2632–2636.

Shaw, J.E., Huang, E–S. , et Pagano, J.S. 1975. Iodination of herpesvirus nucleic acids. J. Virol. 16: 132–140.

Symington, J., Green, M., et Brackmann, K. 1981. Immunoautoradiographic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: Analysis of adenovirus encoded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 177–181.

Zubay, G. 1973. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. Ann. Rev. Gen. 7: 267 287.

20

IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOPRÉCIPITATION

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

L'identification et l'analyse de protéines virales marquées radioactivement (^{125}I, ^{35}S, ^{32}P, ^{14}C ou ^{3}H), à partir de lysats ou de surnageants de cellules infectées, s'effectuent sur gel de polyacrylamide, après précipitation sélective par un sérum ou un anticorps monoclonal spécifique: la procédure est généralement identifiée sous le nom d'immunoprécipitation. Par la suite, les protéines virales sont révélées par autoradiographie dans le cas des émetteurs gamma (^{131}I et ^{125}I) et bêta (^{32}P) de haute énergie et par fluorographie dans le cas des émetteurs bêta de faible énergie (^{35}S, ^{14}C et ^{3}H). En anglais, on réfère à la technique d'immunoprécipitation sous le nom de RIPA pour "Radio Immune Precipitation Assay". Cette technique, relativement récente, est dérivée des principes de précipitation sérologique qui ont cours en virologie depuis plus de vingt ans. Les utilisateurs éventuels sont invités à consulter la revue de Goding (1983) qui contient un guide détaillé de la méthode et celle de Ohara et al. (1985) dans laquelle l'on compare l'efficacité d'une dizaine de tampons couramment utilisés en immunoprécipitation. Pour la section autoradiographie et fluorographie, nous vous référons aux articles de Bonner et Laskey (1974), Laskey et Mills (1975 et 1977) et Swanstrom et Shank (1978).

2. MÉTHODE

La méthode que nous utilisons couramment dans nos laboratoires (voir représentation schématique, Figure 1) tire avantage de l'affinité de la protéine A de *Staphylococcus aureus* pour le fragment Fc des IgG de mammifères (Kessler, 1981). Les conditions expérimentales utilisées présentent quelques petites modifications de la méthode proposée par Norrby *et al.*(1981), tandis que l'électrophorèse est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Bien que nous utilisons couramment l'équipement de la compagnie Bio-Rad (Mississauga, Ont., Canada), l'équipement vendu par Pharmacia (Uppsala, Suède) ou Hoefer Scientific (San Francisco, Ca, USA) sont tout aussi satisfaisants.

Solutions

Tampon RIPA

Tris-HCl pH 7.4	0.10 M
NaCL	0.15 M
KCl	0.60 M
$MgCl_2$	5 mM
Triton X-100	2%
SDS	0.1%
PMSF (phenylmethylsulfonyl-fluoride)	1 mM
Trasylol Aprotinin	100 U/mL

Dans plusieurs cas, il est préférable de ne pas utiliser le détergent SDS qui altère la structure tridimensionnelle des protéines et la rend méconnaissable par certains anticorps monoclonaux en particulier.

Tampon dissociant et réducteur

H_2O	4.7 mL
Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8)	1.0 mL
Glycérol	1.0 mL
SDS (10% p/v)	1.0 mL
2-mercaptoéthanol	0.1 mL
Bleu de bromophénol (0.05%)	0.2 mL

Si le 2-mercaptoéthanol est omis, les ponts disulfures seront conservés et le tampon sera un tampon dissociant, non réducteur.

Méthode

1. Dans un microtube de 1.5 mL, mettre en contact 50 µL de Protéine-A-Sepharose Cl-4B (0.28 g/1.5 mL; Pharmacia, Uppsala, Suède) avec 10 µL de sérum convalescent ou de liquide d'ascite ou 200 µL de surnageant d'hybridome.

2. Les immunoglobulines sont adsorbées à la protéine A durant 2 h à 37°C, sous agitation constante à l'aide d'un appareil agitateur.

3. Après déposition au culot par centrifugation avec la centrifugeuse Beckman J6 à 500 rpm (rotor 4.2) durant 5 min, les immunobilles (protéine A + anticorps) sont lavées trois fois avec 1 mL de tampon RIPA avec agitation au Vortex durant 30 sec.

4. Les lysats cellulaires ou les surnageants concentrés de cellules infectées, dont les protéines sont marquées radioactivement, sont solubilisés par traitement avec le tampon RIPA (2:1 v/v).

5. La suspension est ensuite clarifiée par ultracentrifugation à 25 000 rpm durant 45 min (Beckman, rotor SW 50.1). Le surnageant est récolté et utilisé pour l'immunoprécipitation.

6. Les immunobilles sont mises en contact avec 100 µL (environ 50 000 cpm) d'échantillons viraux.

7. L'incubation est effectuée à 37°C durant 2 h sous agitation constante.

8. Suivent trois lavages successifs par centrifugation dans du tampon RIPA (500 rpm, 5 min).

9. Le culot contenant les protéines virales immunoprécipitées est resuspendu dans du tampon dissociant pour électrophorèse et chauffé à 100°C durant 5 min. avant d'être chargé dans les puits d'électrophorèse.

10. Pour l'électrophorèse, nous utilisons un gel de polyacrylamide de 3% p/v comme gel de regroupement et un gel de 12% comme gel de séparation. Afin de déterminer le temps d'exposition, un comptage en scintillation liquide est effectué (5 µL d'échantillon pour 10 mL d'Aquasol).

Dans le cas des émetteurs radioactifs de haute énergie (^{125}I, ^{32}P), les protéines peuvent être détectées directement après électrophorèse par autoradiographie:

11. Le gel est délicatement détaché des plaques de verre, fixé dans une solution de méthanol 30% (v/v) et 10% (v/v) acide acétique, puis séché sous-vide à l'aide d'un sécheur de gel, durant 90 min à 60°C (Bio-Rad, modèle 443 ou 483).

12. Les gels séchés sont ensuite exposés avec un film X–Omat AR–5 (Kodak, Rochester N.Y., USA) dans une cassette Wolf (Picker Corporation, Cleaveland, Ohio, USA) avec un écran intensifiant Lightning Plus (Dupont, Wilmington, De, USA). Le temps d'exposition à –70°C est déterminé par l'activité du marqueur radioactif utilisé et sa quantité incorporée dans l'échantillon. Il peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Les gels peuvent aussi être exposés sans séchage, mais la résolution peut en souffrir.

Dans le cas des émetteurs radioactifs de faible énergie (^{3}H, ^{14}C, ^{35}S), la détection est faite par fluorographie:

11. Après avoir fixé le gel, celui-ci est immergé dans une solution d'Enlightning™ (New England Nuclear, Boston, MA, USA), contenant du 2.5–diphényloxazole pour transformer l'émission de rayons bêta pouvant marquer un film approprié. Il s'agit en fait d'une autoradiographie par scintillation, appelée fluorographie.

12. Le gel est ensuite séché sous vide et exposé à –70°C avec un film Kodak X-Omat AR–5 dans une cassette Wolf. Le temps d'exposition dépend de l'activité spécifique du marqueur et son degré d'incorporation. Nous exposons de 4 jours à deux semaines selon les cas et l'intensité désirée.

    Selon Bonner et Laskey (1974), 3000 disintégrations par minute (dpm) de ^{3}H peuvent être détectées en 24 h d'exposition et 500 désintégrations (dpm) peuvent être détectées en 1 semaine. Lorsqu'appliqué au ^{35}S et au ^{14}C, la méthode est dix fois plus sensible et permet la détection de 130 désintégrations (dpm) en 24 h.

Note sur la toxicité du Enlightning: Ce produit peut causer une irritation des yeux et de la peau. Il est recommandé de l'utiliser dans un endroit bien ventilé et de porter des gants.

13. Les films X–Omat AR–5 sont développés dans la solution Kodak Developper and Replenisher durant 4 min. Suit un bain d'acide acétique (v/v), durant 30 sec. Les films sont ensuite fixés avec la solution Kodak Rapid Fixer and Hardener durant 2 min, puis rincés à l'eau courante

avant d'être séchés à l'air libre ou dans une étuve à air circulé.

3. DISCUSSION

La Figure 2, montre les résultats en immunoprécipitation du virus herpes bovin type 1 avec un sérum convalescent et un anticorps monoclonal neutralisant. La piste 1 nous montre une multitude de bandes parmi lesquelles il est difficile d'identifier les protéines virales. Par immunoprécipitation (piste 2) le patron de protéines virales est précisé et les protéines cellulaires sont éliminées. Cette technique nous permet d'identifier clairement par quelle protéine est porté l'épitope défini par un anticorps monoclonal ayant une activité neutralisante: la piste 4 nous montre qu'un épitope de neutralisation est porté sur la glycoprotéine de 90 000 Da.

Plusieurs points doivent être considérés comme critiques pour obtenir des résultats optimums. Le sérum immun doit être spécifique aux protéines virales avec peu ou pas de réaction avec les cellules utilisées pour produire le virus. Pour ce faire, un sérum convalescent après une infection naturelle est toujours préférable à un sérum produit par l'inoculation d'animaux de laboratoire. Lorsque l'on ne dispose pas de sérum convalescent, une infection par voie naturelle est recommandé (instillation ou ingestion). Il faut toujours inclure un témoin négatif ou présérum. En général, les anticorps monoclonaux ont une très grande spécificité; cependant dans plusieurs cas où plus d'une protéine est immunoprécipitée, il faut inclure des témoins appropriés pour contrôler s'il s'agit de sous-unités d'une même protéine ou s'il s'agit de réactions croisées (reconnaissance du même épitope porté par des protéines différentes).

Bien que la précipitation des complexes antigènes anticorps soit efficace avec la protéine A, il est à noter que certaines immunoglobulines du groupe G réagissent mal avec cette protéine. C'est en particulier le cas de l'IgG_3 humaine (voir Bulletin No 5, Separation News de Pharmacia, 1979). Il peut donc parfois être utile d'avoir recours à un anti-sérum anti-IgG que l'on fixe à la protéine A-Sepharose pour immunoprécipiter. On procède de la façon suivante: dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, on met en contact 50 µL de protéine A-Sepharose avec 10 µL d'anti-sérum anti-IgG, durant 2 h à 37°C, avec agitation constante. Cette étape est suivie de 3 lavages avec le tampon RIPA et l'on poursuit la technique telle que décrit précédemment. Plusieurs auteurs utilisent une centrifugeuse de type Eppendorf (Brinkman, Westbury, N.Y., USA) pour effectuer les lavages des immunobilles et des immunoprécipitats. Ce type de centrifugeuse fonctionne à 12 800 x *g* et sédimente souvent des agrégats non spécifiques. D'autre part, l'utilisation d'une centrifugeuse générant un champ gravitationnel inférieur à 500 x *g*, est suffisant pour sédimenter les complexes immuns mais évitant d'entraîner plusieurs des contaminants laissés en suspension.

Au cours de l'électrophorèse des échantillons immunoprécipités, il est utile d'inclure des marqueurs de masse moléculaire pour identifier et caractériser les bandes observées. L'on utilise des marqueurs radioactifs disponibles de New England Nuclear (methylated ^{14}C-labelled proteins): les masses moléculaires des protéines disponibles couvrent la gamme de 5 760 à 200 000 Da, ce qui est suffisant dans la plupart des cas. Etant donné le grand nombre de marqueurs radioactifs disponibles sur le marché, comment peut-on fixer son choix afin d'obtenir un bon rendement en fonction du coût?

Notre choix s'est porté sur le ^{14}C comme marqueur d'acides aminés ou de précurseurs saccharidiques des glycoprotéines, car il est un constituant de tous les acides aminés et hydrate de carbone, d'où la facilité d'obtenir un meilleur marquage. Cet isotope radioactif a une longue demi-vie (5 760 années) et peut être détecté à 150 dpm comparativement à 3000 dpm pour le ^{3}H (demi-vie de 12.26 années) soit un facteur 20 fois plus élevé. Pour obtenir la même détection lorsque nous utilisons 5 µCi/mL pour le marquage, nous préparons beaucoup moins d'échantillon viral; conséquemment, le coût est moindre, même si ce produit est plus coûteux. Le ^{35}S présente le désavantage de n'être associé qu'à seulement deux acides aminés, la méthionine et la cystine et le marquage des protéines avec ces deux précurseurs est inégal ou absent dans le cas de protéines n'ayant pas de méthionine ou de cystine. Aussi, sa demi-vie (87.2 jours) peut limiter son utilisation. Le ^{32}P (demi-vie de 14.3 jours) est surtout utilisé pour marquer les acides nucléiques et, en quelques rares occasions, pour marquer les phosphoprotéines. L'iode–125 (demi-vie de 60 jours) n'est utilisé qu'après marquage chimique et souvent la protéine est endommagée par ce traitement. Cet isotope a l'avantage d'être comparativement très peu cher mais sa demi-vie est relativement courte.

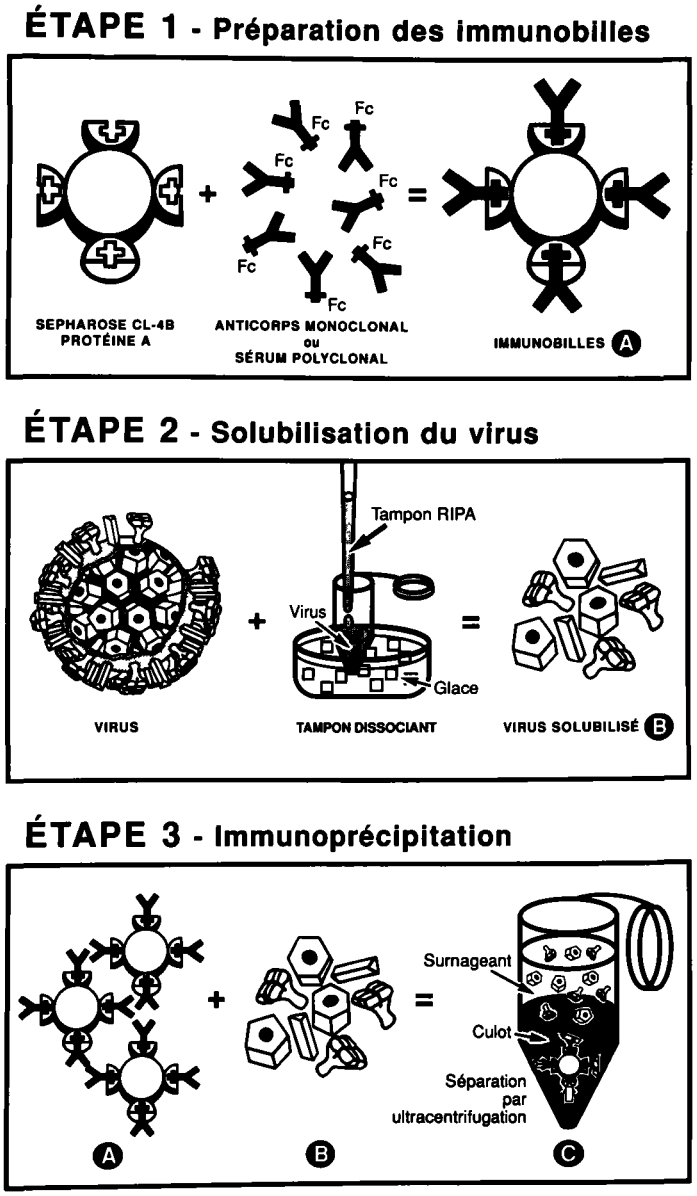


Figure 1

Représentation schématique des différentes étapes d'immunoprécipitation avec un anticorps monoclonal

(A) L'anticorps monoclonal est adsorbé aux billes de Sepharose-protéine A. (B) Le virus est dissocié en ses différentes sous-unités protéiques avec du tampon RIPA. (C) Les immunobilles préparées en A sont mises en contact avec les protéines virales solubilisées: il y a liaison spécifique de l'anticorps monoclonal avec son épitope porté par une des protéines virales; le complexe protéine virale-immunobilles est ensuite séparé par centrifugation et analysée par électrophorèse et fluorographie.

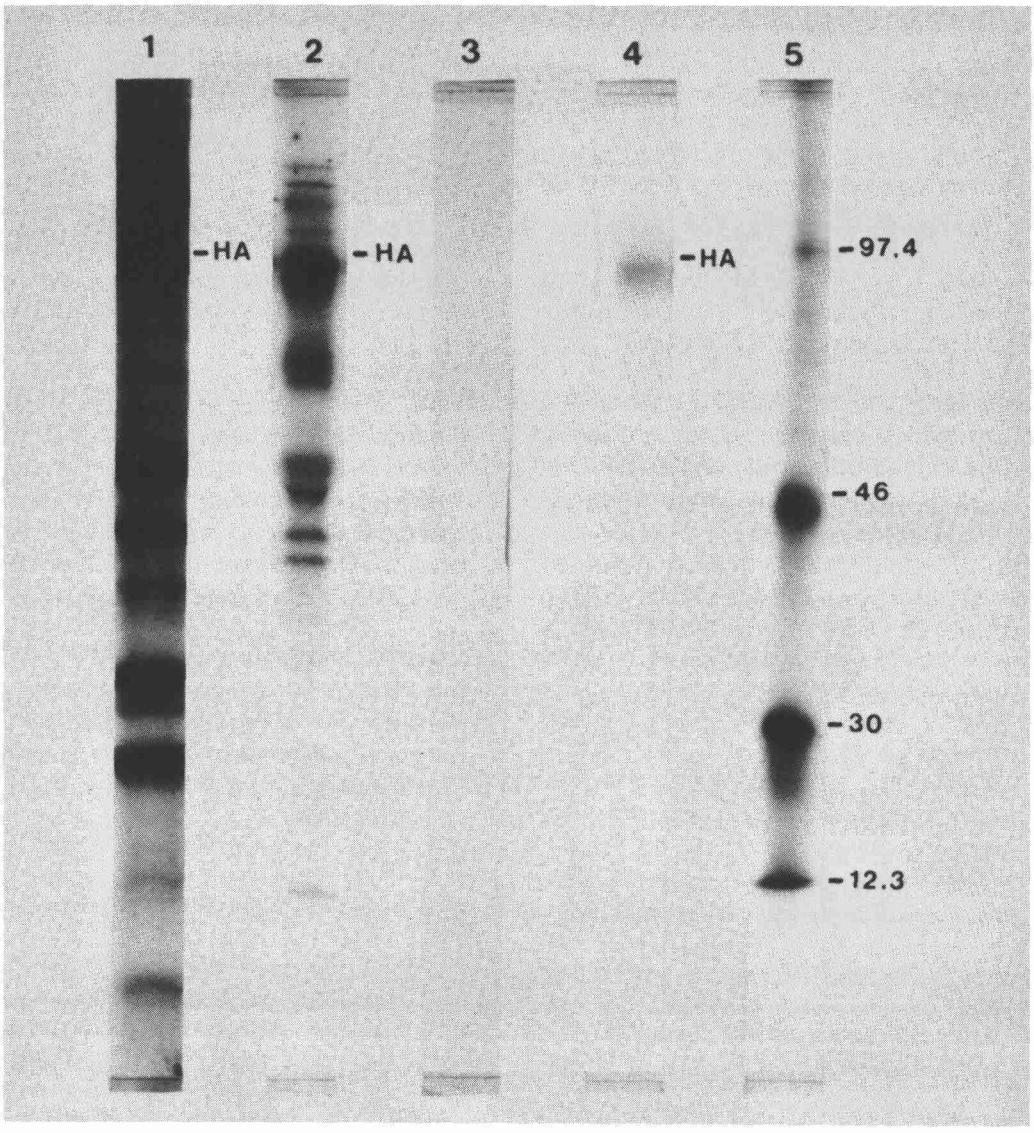


Figure 2

Immunoprécipitation des protéines virales du virus herpès bovin type 1 avec un sérum convalescent et un anticorps monoclonal neutralisant.

1. Surnageant viral solubilisé.

2. Protéines virales immunoprécipitées par un sérum convalescent, titre neutralisant 1/258.

3. Témoin négatif immunoprécipité avec un sérum négatif.

4. Anticorps monoclonal neutralisant identifiant un épitope majeur de neutralisation sur l'hémagglutinine de 90 000 Da.

5. Marqueurs de masse moléculaire marqués au ^{14}C: phosphorylase B (97 400), ovalbumine (46 000) anhydrase carbonique (30 000), cytochrome (12 300).

4. RÉFÉRENCES

Bonner, W.M. et Laskey, R.A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88.

Goding.J.W. 1983. Monoclonal antibodies: Principles and practices. Academic Press, New York, 276 pages.

Kessler, S.W. 1981. Use of protein A–bearing staphylococci for the immuno-precipitation and isolation of antigens from cells. Meth. Enzymol. 73: 442-471.

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

Laskey, R.A. et Mills, A.D. 1975. Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56: 335-341.

Laskey, R.A. et Mills, A.D. 1977. Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Letters 82: 314-316.

Norrby, E., Örvell, C., Vanvik, B. et Cherry, J.D. 1981. Antibodies against measles virus polypeptides in different disease conditions. Infect. Immun. 34: 718-724.

Ohara, Y., Tashiro, M., Takase, S. et Homma, M. 1985. Detection of antibody to M protein of measles virus in patients with subacute sclerosing panencephalitis: A comparative study on immunoprecipitation. Microbiol. Immunol. 29: 709-723.

Swanstrom, R. et Shank, P.R. 1978. X–ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes ^{32}P and ^{125}I. Anal. Biochem. 86: 184-192

21

IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOEMPREINTE

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

Une approche nouvelle pour l'identification des protéines virales connaît, depuis quelques années, un essor important. Il s'agit de l'immunodétection de protéines séparées par électrophorèse, transférées sur papier de nitrocellulose ou diazobenzyloxyméthyle avant d'être révélées par un sérum polyclonal ou un anticorps monoclonal. Le nom d'immunoempreinte semble de plus en plus réservé pour identifier cette technique; en anglais, on la désigne sous le nom de Western-blotting. Les ouvrages à consulter sont ceux de Renart *et al.* (1979), Towbin *et al.* (1979) et Burnette (1981) Gooderham (1982) et Beisiegel (1986). Cette technologie, dérivée des méthodes d'immunofixation directe sur gels d'électrophorèse, donne une meilleure résolution. Elle a aussi donné lieu au développement d'épreuves rapides d'immunodétection ponctuelle mieux connue en anglais sous le nom de "dot-blot" (Sternberg et Jeppesen 1983, Alric *et al.* 1986, Heberling et Kalter 1986). Tout comme la technique d'immunoprécipitation précédemment décrite, cette technique tire avantage de l'affinité de la protéine A pour le fragment Fc des IgG ou de l'affinité d'un anti–IgG, afin de détecter le complexe immun (Burnette 1981): la protéine A ou l'anti–IgG peuvent être couplés à un marqueur fluorescent (fluorescéine), radioactif (radioiodination) ou enzymatique (peroxydase). On a aussi rapporté l'utilisation de lectines pour la détection des glycoprotéines (Ramirez *et al.* 1983). Récemment, la détection par marquage à l'or colloïdal connaît aussi une popularité grandissante (Hsu 1984, Brada et Roth 1984).

2. MÉTHODE

La méthode que nous préférons utiliser pour la détection des complexes immuns tire avantage de l'affinité de la protéine A marquée à la peroxydase. L'électrophorèse initiale pour la séparation des protéines virales est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Le tranfert électrophorétique des protéines virales isolées est effectué sur feuilles de nitrocellulose selon la méthode de Towbin *et al.* (1979). La détection des complexes protéines-anticorps s'effectue avec la protéine A couplée à la peroxydase

(Burnette 1981, Tsang *et al.* 1983), sauf que l'iode radioactif est remplacé par l'enzyme.

Solutions

Tampon TBS (Tris-Buffered-Saline)

Tris base (50 mM) ..... 6.57 g

NaCl (150 mM) ..... 8.77 g

Merthiolate 0.01% (p/v) ..... 0.1 g

Compléter à 1 L avec H_2O et ajuster à pH 7.4 avec HCl 12 N

Tampon TBS-T

Tampon TBS ..... 999 mL

Tween 20 (0.1%) ..... 1 mL

Solution colorante

Dissoudre 50 mg de DAB (3–3' diamino benzydine hydrochloride) dans 100 mL de tampon TBS. Filtrer la solution sur papier Whatman No 1 et immédiatement avant son utilisation, ajouter 100 µL de peroxyde d'hydrogène (30% v/v)

2.1. TRANSFERT ÉLECTROPHORÉTIQUE

1. Remplir la cellule de transfert (Bio-Rad, Trans-Blot Cell, Mississauga, Ontario, Canada) de tampon d'électrophorèse additionné de 20% (v/v) de méthanol. La quantité requise est d'environ deux litres: on peut utiliser le tampon qui a déjà servi à l'électrophorèse.

2. Placer une éponge déja imbibée de tampon de transfert sur un côté de la cassette et y déposer un carré de papier filtre (Whatman No 1 ou équivalent) (Figure 1).

3. Déposer le gel d'électrophorèse sur le papier filtre et recouvrir d'un papier de nitrocellulose (membrane de nitrocellulose, porosité 0.45 µm). Il faut bien identifier l'orientation du gel sur le papier et faire attention qu'il n'y ait pas de poches d'air entre la membrane de nitrocellulose et le papier filtre.

4. Couvrir la feuille de nitrocellulose d'une seconde feuille de papier filtre déjà imbibée de tampon de tranfert.

5. Placer la seconde éponge sur le dernier papier filtre puis, refermer la seconde moitié de la cassette et presser la cassette de manière à la refermer. Insérer la cassette montée dans la cellule de transfert. Assurez-vous que la membrane de nitrocellulose est entre le gel et l'anode (pôle positif, électrode rouge; Figure 1).

6. Si l'on désire contrôler la température durant le transfert, il faut brancher l'échangeur de chaleur au bain à température contrôlée et placer la chambre de transfert sur un agitateur magnétique: il faut maintenir l'agitation au minimum pour diminuer le courant généré et ainsi éviter que le tampon de transfert soit poussé entre le gel et la membrane de transfert. La séparation du gel de la membrane de nitrocellulose entraîne une distortion dans le patron de transfert.

7. Pour effectuer le transfert, monter le couvercle de branchement et raccorder à la source de tension (ex.: Bio-Rad, modèle 250/2.5). Pour le tranfert des protéines, ajuster le courant à 50 volts, durant 1 à 1.5 h).

8. Lorsque le transfert est complété, fermer la source de tension, enlever

la cassette de la chambre et récupérer le papier de nitrocellulose et le gel. Le papier de nitrocellulose peut être conservé à –20°C durant 6 mois ou utilisé immédiatement pour l'immunoempreinte.

9. Afin de vérifier si le transfert s'est bien effectué, le gel peut être coloré dans une solution de bleu de Coomassie (0.25% (p/v) dans 30% (v/v) de méthanol et 12% (v/v) d'acide acétique, durant la nuit et décoloré dans trois bains successifs de méthanol 30%-acide acétique 12%.

2.2. IMMUNOEMPREINTE

1. La feuille de nitrocellulose sur laquelle on a transféré les protéines provenant du gel d'électrophorèse est placée dans un sac de plastique à fermeture hermétique, genre Ziplock. On y ajoute 10 mL de solution de bloquage (1.5% d'albumine bovine dans du tampon TBS), sous agitation constante, sur un plateau basculant (Rocker plate, Bellco, Vineland, N.J. USA) à la température de la pièce. Après utilisation, la solution de bloquage est jetée.

2. On ajoute ensuite 10 mL de sérum convalescent ou d'anticorps monoclonal à la dilution appropriée (1/100 pour sérum polyclonal, 1/20 pour surnageant d'hybridome ou 1/100 pour liquide d'ascite) puis on incube à température de la pièce, durant 2 h, sous agitation constante.

3. L'immunoempreinte est alors lavée trois fois dans du tampon TSB–T pour des périodes de 10 min.

4. On ajoute ensuite 10 mL d'une solution de protéine A ou d'anti-immunoglobulines, marquées à la peroxydase, spécifiques aux sérums ou aux anticorps monoclonaux utilisés pour former les complexes protéine A-fragments Fc des immunoglobulines ou aux anticorps anti-immunoglobulines (sérum anti-IgG de souris pour les anticorps monoclonaux murins, anti–IgG de cobaye pour sérum convalescent de cobaye, etc.); puis on incube 2 h à température de la pièce, sous agitation constante. La dilution de la protéine A-peroxydase est généralement 1/2000 dans du tampon TBS–T, tandis que les sérums anti–IgG de haute affinité sont utilisés à des dilutions de 1/3000 à 1/6000.

5. L'immunoempreinte est alors lavée trois fois dans du tampon TBS-T, comme précédemment décrit; elle est ensuite révélée par l'addition de 10 mL d'une solution de DAB (3–3'diamino benzidine hydrochloride), durant 10 à 15 min, sous agitation constante, jusqu'à l'obtention de l'intensité désirée. Le papier de nitrocellulose est ensuite rincé à l'eau déionisée pour arrêter le développement de la couleur.

6. L'immunoempreinte est séchée dans un incubateur ventilé.

3. DISCUSSION

En général, les antisérums réagissent bien en immunoempreinte; par contre plusieurs anticorps monoclonaux, ayant une spécificité pour un seul épitope, ne se fixent pas. L'épitope reconnu est probablement détruit par les conditions d'électrophorèse. Dans ces cas, l'immunoprécipitation est tout indiquée pour déterminer leur spécificité (Figure 2).

la majorité des chercheurs préfèrent utiliser les membranes de nitrocellulose: elles permettent la détection de 10 à 50 pg de

protéines et ne nécessitent pas d'activation; cependant elles n'acceptent pas les transferts électrophorétiques d'acides nucléiques. D'autres types de membranes sont disponibles: en particulier le zeta-probe (Bio-Rad) avec une sensibilité similaire au nitrocellulose, mais qui permet la fixation d'acides nucléiques; il existe aussi les papiers aminobenzyloxyméthyle (AMB; Bio-Rad) et diazo (DBM) qui acceptent les protéines et acides nucléiques mais qui requièrent une étape d'activation. Les papiers diazo fixent aussi les acides aminés libres, c'est pourquoi les tampons tris-glycine ne peuvent être utilisés: il faut alors utiliser un tampon phosphate ou borate. Enfin, mentionnons les papiers échangeurs d'anions DEAE (diethyl-amino-ethyl): leur avantage principal la récupération du matériel transféré.

Il est important de noter que toutes les protéines ne sont pas transférées à la même vitesse et que les protéines d'une masse moléculaire supérieure à 60 000 Da sont retardées par rapport à celles de masse moléculaire inférieure. Pour le transfert de protéines de masse moléculaire élevée, Gibson (1981) propose une digestion enzymatique partielle; cependant, cette approche risque de détruire certains épitopes qui ne seraient plus reconnus par les anticorps monoclonaux. Il est à noter que les tranferts par capillarité sont de 10 à 100 fois moins efficaces.

Enfin, un mot sur les marqueurs de poids moléculaire. En général, on utilise des standards de faible ou haute masse moléculaire (14 400 à 92 500 ou 45 000 à 200 000 Da), que l'on colore sur le papier de nitrocellulose après transfert. La coloration utilisée est le bleu de Coomassie à 0.05% (p/v), durant 3 minutes, suivie de bains décolorants dans la solution méthanol (30%)/acide acétique (12%). Les différentes compagnies telles que Bio-Rad, Pharmacia ou Sigma offrent maintenant des marqueurs précolorés qui sont visibles lorsque transférés.

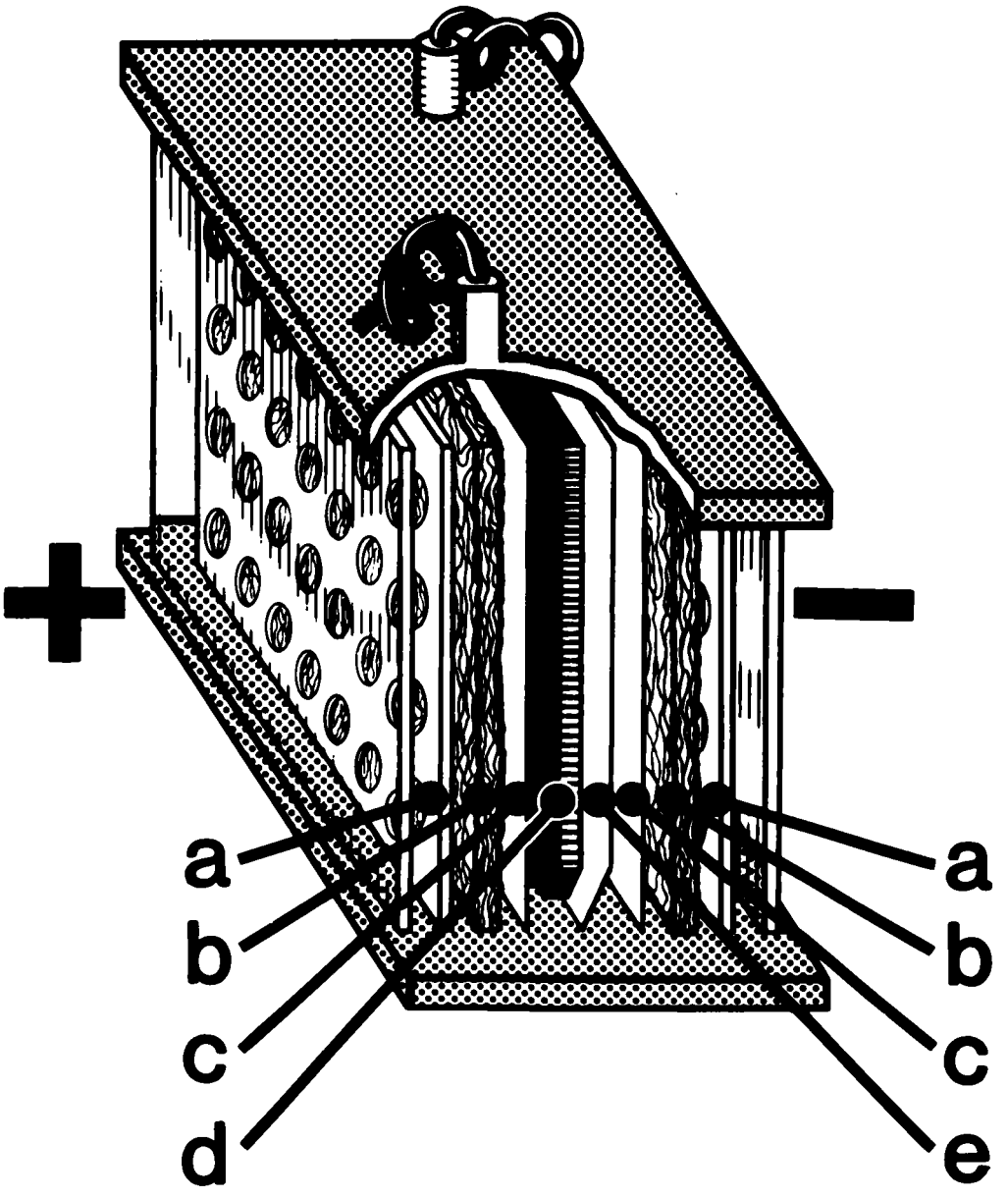


Figure 1

Représentation schématique de la disposition des divers élements d'une cassette de tranfert, identifiant les positions respectives du gel et de la feuille de nitrocellulose: parties supérieure et inférieure de la cassette (a), éponges (b). papier filtre (d), gel d'électrophorèse (e), et feuille de nitrocellulose (f).

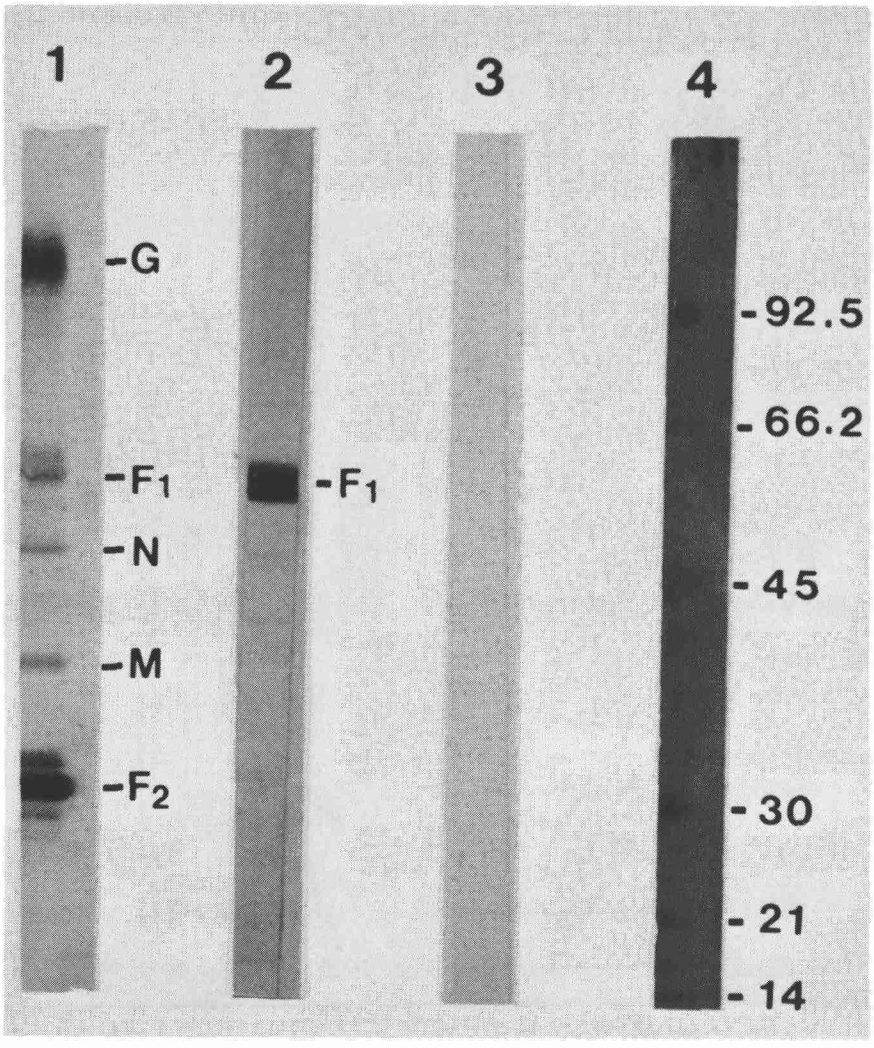


Figure 2

Immunoempreinte identifiant les protéines structurales du virus respiratoire syncytial humain à l'aide d'un sérum convalescent et d'un anticorps monoclonal neutralisant l'infectivité:

1. Sérum convalescent identifiant les cinq protéines structurales du virus.

2. Localisation d'un épitope de neutralisation sur la glycoprotéine F1 à l'aide d'un anticorps monoclonal.

3. Sérum négatif.

4. Marqueurs: phosphorylase B (92 500), albumine sérique bovine (66 200), ovalbumine (45 000), anhydrase carbonique (31 000), inhibiteur de trypsine (21 500) et lysozyme (14 400).

4. RÉFÉRENCES

Alric, M., Cheyvialle, D. et Renaud, M. 1986. Cross-blot and cross-dot system: A high- performance system for the detection of antigen-antibody complexes on nitrocellulose. Anal. Biochem. 155: 328-334.

Beisiegel, U. 1986. Protein blotting. Electrophoresis 7: 1-18.

Brada, D. et Roth, J. 1984. "Golden blot"- Detection of polyclonal and monoclonal antibodies bound to antigens on nitrocellulose by protein A-gold complexes. Anal. Biochem. 142: 79-83.

Burnette, W.N.. 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112: 195-203.

Gibson, W. 1981. Protease-facilitated transfer of high molecular weight proteins during electro-transfer to nitrocellulose. Anal. Biochem. 118: 1-3.

Gooderham, K.. 1984. Protein blotting. dans Methods in molecular biology 1: Proteins, 165-178. J.M. Walker (Edit), Humana Press, N.J., 365 pages.

Heberling, R.L. et Kalter. S.S. 1986. Rapid dot-immunobinding assay on nitrocellulose for viral antibodies. J. Clin. Microbiol. 23: 109-113.

Hsu, Y.H. 1984. Immunogold for detection of antigen on nitrocellulose paper. Anal. Biochem. 142: 221-225.

Ramirez, P., Bonilla, J.A., Moreno, E. et Leon, P. 1983. Electrophoretic transfer of viral proteins to nitrocellulose sheets and detection with peroxydase-bound lectins and protein A. J. Immunol. Meth. 62: 15-22.

Renart, J., Reiser, J. et Stark, G.R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3116-3120.

Sternberg, J. et Jeppesen, P. 1983. Dot-blotting: A novel screening assay for antibodies in hybridoma cultures. J. Immunol. Meth. 64: 29-44.

Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. et Simmons, A.R. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Meth. Enzymology 92: 377-391.

22

CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

Le développement des méthodes de séparation des protéines par électrophorèse a mené, entre autres, à la cartographie peptidique pour caractériser les protéines et identifier les sites actifs des enzymes ou la localisation des déterminants antigéniques. La méthode *in situ* fut développée par Cleveland *et al.* (1977). Elle consiste à cliver chimiquement avec le bromure de cyanogène (Lonsdale-Eccles *et al.* 1981) ou le N-chlorosuccinimide (NCS) (Lischwe et Ochs 1982), ou à cliver avec des endopeptidases telles que la protéase V8 (Drapeau *et al.* 1972), l'endoprotéinase arginine C (Levy *et al.* 1970), la pepsine (Fruton 1976) ou la papaïne (Berger et Schechter 1970) les protéines préalablement séparées par électrophorèse en gels de polyacrylamide. L'hydrolyse ou la digestion se fait directement dans le gel avant la réélectrophorèse dans le cas du CNBr et du NCS, et durant celle-ci avec les enzymes protéolytiques (Tableau 1). En anglais, on désigne cette technique sous le nom de "peptide mapping" ou "fingerprinting". Les fragments générés sont séparés par électrophorèse et révélés au bleu de Coomassie (Cleveland *et al.* 1977), à l'argent (Merrill *et al.* 1980), par autoradiographie (Fairbanks *et al.* 1965), par fluorographie (Bonner et Laskey 1974) ou par immunoempreinte (Towbin *et al.* 1979, Burnette 1981, Tsang *et al.* 1983) après transfert électrophorétique sur membrane de nitrocellulose. Les utilisateurs éventuels sont invités à consulter les revues de James (1978), Allen (1981), Gooderham (1984) ainsi que de Salinovich et Montelaro (1986a, b).

2. SÉPARATION DES PROTÉINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Méthode

1. L'électrophorèse de protéines virales en plaques verticales, s'effectue selon la méthode de Laemmli (1970) en gel de polyacrylamide 7.5%. Les différentes solutions et tampons sont décrits dans le Tableau 2.

2. Un peigne plein est utilisé pour le puits d'échantillon afin que la bande de protéine séparée soit continue et occupe toute la largeur du gel.

3. Après l'électrophorèse, une mince bande de gel est prélevée de chaque côté de la plaque et sert à l'identification des protéines, soit par coloration au bleu de Coomassie, à l'argent ou encore à l'identification par immunoempreinte.

4. Une fois la protéine d'intérêt repérée, la bande non colorée est localisée par alignement des bandes du gel et est découpée de la plaque non colorée. Des fragments d'environ 1 cm de cette bande serviront pour la cartographie avec les différents produits chimiques ou enzymes. Chaque fragment devrait contenir environ 25 µg de la protéine.

3. CLIVAGE CHIMIQUE

3.1. BROMURE DE CYANOGÈNE (CNBr)

1. **Équilibrer un fragment de gel, contenant la protéine désirée dans l'acide** formique 70% (v/v): deux bains de 10 min dans 4.5 mL seront suffisants.

2. Faire réagir des fragments de gel dans un tube vissé contenant 4.5 mL d'acide formique 70% et du CNBr à différentes concentrations: en général, 5 mg/mL donne de bons résultats. La digestion s'effectue à 37°C, durant 16 h, à l'abri de la lumière. Préparer aussi un témoin gel/acide acétique sans CNBr.

3. Décanter la solution de CNBr et laver les gels trois fois dans l'acide acétique 10% (v/v), durant 10 min, sous agitation constante.

4. Rééquilibrer les fragments de gel en effectuant 4 lavages de 10 min dans 4.5 mL de tampon Tris-HCl (0.5 M, 0.04% SDS, pH 6.8).

5. Placer chaque fragment broyé dans un puits d'un gel de 15 à 20% (p/v) d'acrylamide ou encore sur un gel de 15% et séparer par électrophorèse.

Note: Le CNBr doit être manipulé sous une hotte chimique. Il doit aussi être désactivé par l'addition d'une concentration équimolaire d'hypochlorite pendant 24 h avant d'être jeté.

3.2. N-CHLOROSUCCINIMIDE (NCS)

1. Laver le fragment de gel dans deux bains de 10 min d'eau distillée (25 mL).

2. Équilibrer le fragment de gel dans une solution urée-eau-acide acétique (urée 1 g, H_2O 1 mL, acide acétique glacial 1 mL). Effectuer deux lavages de 10 min dans 10 mL de solution.

3. Effectuer le clivage en ajoutant le NCS 0.15 M dans 10 mL d'une solution urée/ H_2O/ acide acétique et en incubant durant 30 min à la température de la pièce.

4. Effectuer deux lavages avec 25 mL d'eau distillée.

5. Équilibrer le gel (trois bains de 50 min) dans 10 mL de tampon Tris (Tris-HCl 0.625 M; 0.1% (p/v) SDS, pH 6.8).

6. Placer chaque fragment de gel broyé dans un puits d'un gradient de gel de 15 à 20% d'acrylamide ou encore un gel de 15% et séparer par électrophorèse.

3.3. CLIVAGE ENZYMATIQUE

Le clivage ou digestion enzymatique comporte trois étapes:

- le contact de la protéine et de l'enzyme dans le gel de regroupement
- un arrêt de 30 min pour favoriser la digestion
- la séparation des peptides dans le gel de séparation

1. Placer chaque fragment de gel broyé resuspendu dans 50–100 µL de tampon Tris-HCl pH 6.8 (0.125 M, 0.1% SDS, 10% glycérol) dans un puits d'un gel de regroupement (voir Solutions au Tableau 3, gel riboflavine) à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 18G 1–1/2 ".

2. Ajouter au dessus du gel, dans chaque puits, 25 µL d'enzyme à la concentration appropriée (5 à 20 µg), diluée dans du tampon Tris-HCl pH 6.8 (0.125 M, 0.1% SDS, 20% glycérol, 0.001% bleu de bromophénol).

3. Effectuer l'électrophorèse avec un tampon Tris/ glycine/SDS à un courant constant de 25 mA et voltage continu (devrait commencer à 50 V). Cette étape doit se faire très lentement (environ 2 h) pour favoriser le contact entre l'enzyme et la protéine.

4. Arrêter le courant après 30 min, lorsque le bleu de bromophénol arrive à l'interface du gel de regroupement et du gel de séparation, encore une fois pour favoriser la digestion.

5. Continuer l'électrophorèse pour la séparation des peptides dans un gradient de gel de 15-20%, à un courant se situant entre 50 à 70 mA, pendant environ 3 h.

6. Prélever le gel et le fixer pour la coloration au bleu de Coomassie ou à l'argent, ou transférer sur papier de nitrocellulose pour détection par immunoempreinte. Le transfert électrophorétique se fait à l'aide d'un appareil Trans-Blot (Bio-Rad; voir section Immunoempreinte) pendant environ 1 h à 50 V.

La Figure 1 illustre les résultats obtenus.

4. DISCUSSION

Certains points méritent d'être examinés afin d' obtenir une meilleure séparation des peptides digérés. L'utilisation d'un gel de séparation en gradient de 15 à 20% en remplacement d'un gel de 15% donne une meilleur séparation des fragments de faible masse moléculaire.

La concentration d'enzyme à utiliser doit être établie en fonction de l'activité spécifique de l'enzyme et du mode de détection des peptides générés. Certains auteurs recommandent d'utiliser des échantillons de 0.05 µg. Nous préférons utiliser des échantillons plus concentrés, soit d'environ 0.1 à 5 µg: pour identifier des peptides conservant leurs déterminants antigéniques, nous utilisons 25 µg ou plus car la sensibilité en immunoempreinte est faible. Certains laboratoires utilisent des marqueurs moléculaires inclus dans le gel pour identifier la masse des peptides digérés parce que les protéines libres migreraient plus rapidement causant ainsi une surévaluation de la masse moléculaire. En travaillant avec les fragments de gel broyés, nous n'avons pas noté cette surévaluation et nous utili-

sons directement les marqueurs de masse moléculaire. Nous utilisons les marqueurs de Pharmacia (Uppsala, Suède): myoglobine 17 200 Da, myoglobine I+II 14 600 Da, myoglobine I 8 240 Da, myoglobine II 6 380 Da, myoglobine III 2560 Da. Les protéines isolées en gel peuvent être préparées d'avance pour la digestion. Elles sont entreposées dans des sacs hermétiques et conservées à -20°C pendant plusieurs mois.

Tableau 1

Identification des sites de clivage des protéines

A) Digestion chimique

Produit	Acide aminé cible	Références
CNBr (bromure de cyanogène)	méthionine	Gross, 1967 Londsdale-Eccles *et al*, 1981
NTCB (acide 2-nitro-5-thiocyanobenzoïque)	cystéine	Stark, 1977
NCS (N-chlorosuccinimide)	tryptophane	Lischwe et Ochs 1982

B) Digestion enzymatique

Enzyme	Acide aminé cible	Références
Protéase V8 *S. aureus*	glutamine	Drapeau *et al*, 1972
Endopeptidase	proline	Koida et Water, 1976 (proline)
Trypsine	arginine, lysine	Butler et Hartley, 1972 Patthy et Smith, 1975
Clostripane	arginine	Mitchell et Harrington, 1968
Protéases A et D (submaxillaire souris)	arginine	Schenkein *et al*, 1977
Chymotrypsine	tryptophane, tyrosine, phénylalanine, leucine, et méthionine	Wilcox, 1970 Walasek et Margoliash, 1977
Pepsine	phénylalanine-X (ac. am. hydrophobe)	Fruton, 1974 Lumsden et Coggins, 1978
Thermolysine	leucine, valine, isoleucine, méthionine, phénylalanine, tryptophane	Heinrikson, 1977
Papaïne	phénylalanine-X-Y	Berger et Schechter, 1970

Tableau 2

Solutions pour électrophorèse

Tampon d'électrophorèse	*Solution A*	*Solution C*
Tris-HCl ..... 12 g	Tris-HCl ..... 18.3 g	Acrylamide ..... 30 g
Glycine ..... 57.6 g	Temed ..... 115 µL	Bis-acrylamide ..... 0.8 g
SDS ..... 4 g	SDS ..... 0.4 g	H_2O ..... 100 mL
H_2O ..... à 4 L	H_2O ..... 50 mL	
Ajuster ..... pH 8.4	Ajuster ..... pH 8.4	

Tableau 3

Préparation des gels

		Gel de séparation	
Produit/Solution	**Gel de regroupement**	**15%**	**20%**
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	5.0 mL	2 mL	2 mL
SDS 10% (p/v)	0.2 mL	–	–
H_2O	9.8 mL	1.9 mL	0.3 mL
Solution A	–	2 mL	2 mL
Solution C	2.5 mL	8.1 mL	10.7 mL
Ammonium persulfate (0.28%)	–	4 mL	4 mL
Riboflavine 0.004% (p/v)	2.5 mL	–	–
TEMED	20 µL	–	–

Note: Le persulfate d'ammonium peut interférer avec certains enzymes: nous utilisons donc la riboflavine pour le gel de regroupement. Ceux qui utilisent le persulfate d'ammonium effectuent une pré-électrophorèse. Nous trouvons suffisant de ne modifier que le gel de regroupement. On doit toujours utiliser une solution fraîche d'ammonium persulfate.

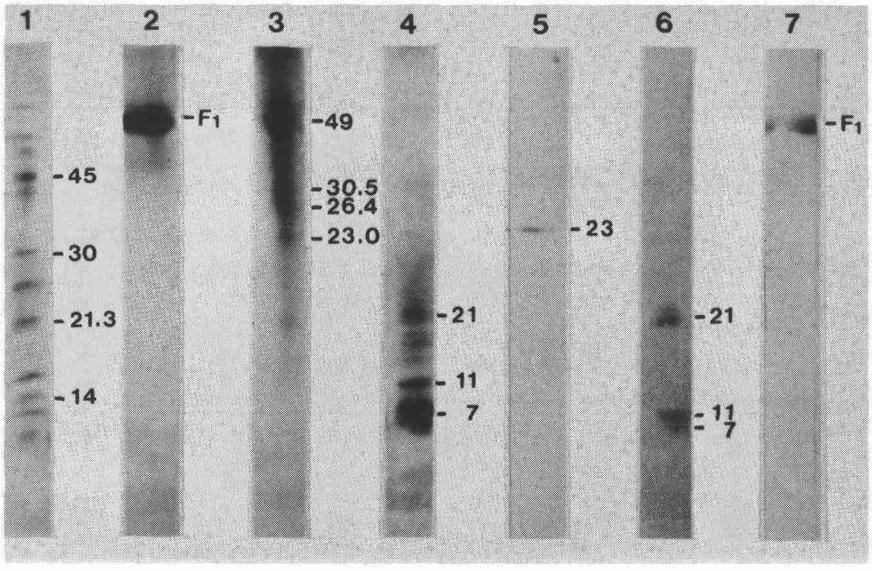


Figure 1

Coloration à l'argent du profil peptidique de la protéine F1 du virus respiratoire syncytial humain (masse moléculaire 49 kDa).

1 et 6. Marqueur de masse moléculaire.

2 et 7 Protéine F1 isolée à partir d'un gel de polyacrylamide de 10%.

3. Digestion chimique de F1 avec le N-chloro-succinimide (NCS) qui clive les résidus tryptophane.

4. Digestion enzymatique de F1 avec la protéase V8 qui clive les résidus glutamine.

5. Immunoempreinte de F1 clivée au NCS et révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal neutralisant (site sur le fragment de 23 kDa).

6. Immunoempreinte de F1 clivée par V8 et révélée à l'aide d'un anticorps monoclonal neutralisant (sites sur les fragments de 21, 11 et 27 kDa).

7. Immunoempreinte de F1.

5. RÉFÉRENCES

Allen, G. 1981. Sequencing of proteins and peptides. Dans *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*. T.S. Work et R.H. Burdon (Édit.). Elsevier/ North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 327pages.

Berger, A. et Schechter, I. 1970. Mapping the active site of papain with the aid of peptide substrates and inhibitors. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B 257: 249-264.

Bonner, W.M et Laskey, R.A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88.

Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. 112: 195-203.

Butler, P.J.G. et Hartley, B.S. 1972. Maleylation of amino groups. Meth. Enzymol. 25: 191-199.

Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. et Laemmli, U.K. 1977. Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252: 1102-1106.

Drapeau, G.R., Boily, Y. et Houmar, J. 1972. Purification and properties of an extracellular protease of *Staphylococcus aureus*. J. Biol. Chem. 247: 6720-6726.

Fairbanks, G., Levinthal, C. et Reeder, R.H. 1965. Analysis of C^{14}-labelled proteins by disc electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Comm 20: 393-399.

Fruton, J.S.. 1976. The mechanism of the catalytic action of pepsin and related acid proteinase. Adv. Enzymol. 44: 1 - 36.

Gooderham, K. 1984. In situ peptide mapping of proteins following polyacrylamide gel electrophoresis. Dans *Methods in molecular biology* 1. Proteins. J.M. Walker (Édit.), Human a Press, Clifton, New Jersey, 365pages.

Gross, E. 1967. The cyanogen bromide reaction. Meth Enzymol. 11: 238-255.

Heinrikson, R.L. 1977. Application of thermolysin in protein structural analysis. Meths Enzymol. 47: 175-188.

James, G.T. 1980. Peptide mapping of proteins. Meths. Biochem. Anal. 26: 165-200.

Koida, M. et Water, R. 1976. Post-proline cleaving enzyme. J. Biol. Chem. 251: 7593-7599.

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

Levy, M., Fishman, L. et Schenskein, I. 1970. Mouse submaxillary gland protease. Meth. Enzymol. ,19: 672-681.

Lischwe, M.A. et Ochs, D. 1982. A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 127: 453-457.

Londsdale-Eccles, J.D., Lynley, A.M. et Dale, B.A. 1981. Cyanogen bromide cleavage of proteins in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Biochem. J. 197: 591-597.

Lumsden, J. et Coggins, J.R. 1978. The subunit structure of the aromatic multienzyme complex of *Neurospora crassa*. Biochem. J. 169: 441-444.

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A. et Ebert, M.H. 1 980. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211: 1437-1438.

Mitchell, W.M. et Harrington, W.F. 1968. Purification and properties of clostridiopeptidase B (clostripan). J. Biol. Chem. 243: 4683-4692.

Patthy, L. et Smith, E.L. 1975. Reversible modification of arginine residues. J. Biol. Chem. 250: 557-564.

Salinovich, O et Montelaro, R.C. 1986a. Reversible staining and peptide mapping of proteins transfered to nitrocellulose after separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 156: 341-347.

Salinovich, O. et Montelaro, R.C. 1986b. Comparison of glycoproteins by two-dimensional mapping of glycosylated peptides. Anal. Biochem 157: 19-27.

Schenkein, I., Levy, M., Franklin, E.C. et Frangione, B. 1977. Proteolytic enzymes from the mouse submaxillary gland. Arch. Biochem. Biophys. 182: 64-70.

Stark, G.R. 1977. Cleavage at cystein after cyanylation. Meth. Enzymol. 47: 129-132.

Towbin, H., Staehelin, T. et Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354.

Tsang, V.C.W., Peralta, J.M. et Simmons, A.R. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. Meth. Enzymol. 92: 377-391.

Wilcox, P.E., 1970. Chymotrypsinigens-Chymotrypsins. Meth. Enzymol. 19: 64-108.

Wolasek, O.F. et Margoliash, F. 1977. Transmission of the cytochrome C structural gene in horse-donkey crosses. J. Biol. Chem. 252: 830-834.

23

ÉLECTROPHORÈSE DE MOLÉCULES D'ADN EN GEL D'AGAROSE

Claude Hamelin

1. ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse en gel d'agarose est l'une des techniques les plus couramment utilisées en recherche sur les acides nucléiques. La séparation de molécules d'ADN selon la taille, le degré de double-hélicité et de superhélicité, la présence de courbures ou de structures en épingle à cheveux, la concentration en protéines liées est réalisée de façon avantageuse dans des gels en plaque (de types submergés ou pontés) pourvus de nombreux puits. Les gels de taille importante offrent la haute résolution des séparations sur longue distance qui est requise pour l'analyse de mélanges complexe d'ADN. Des gels d'agarose miniatures sont toutefois utilisés lorsque vitesse, résolution et sensibilité sont essentielles aux expériences effectuées.

Les appareils à électrophorèse fabriqués selon des plans connus ou achetés de différentes compagnies, ne peuvent habituellement contenir qu'un seul gel de taille plus ou moins grande entraînant souvent une pénurie d'unités et/ou de générateurs de courant dans le laboratoire. L'utilisation d'un appareil de construction simple et peu coûteux, permettant la séparation de nombreux échantillons d'ADN dans de multiples gels de tailles différentes, est décrite ici.

1.1. APPAREIL À ÉLECTROPHORÈSE

L'unité pour électrophorèse (Figure 1) est faite de Plexiglas transparent et comporte deux bassins (30 x 7 x 4.5 cm) contenant le tampon de migration et abritant les électrodes. Les électrodes faites de fil de platine No 28 (Johnson Matthey Ltée) sont attachées à des pièces de Plexiglas (ou de Teflon comme dans la Figure 2) mesurant 29 x 6 x 0.2 cm. Trois petits blocs faits des mêmes matériaux (l'un adossé au support à électrode et les deux autres de chaque côté du réservoir à tampon) sont utilisés pour maintenir l'électrode dans la position verticale. Les gels d'agarose, alignés sur la paroi interne des réservoirs à tampon se faisant face et couverts à chaque extrémité par des ponts à deux épaisseurs de Chiffons–J tout-usages ou de pansements Nu-Gauze (Johnson & Johnson), assurent le passage

du courant entre les deux électrodes, reliées à un générateur de puissance (Bio–Rad, Buchler, Hoefler, Pharmacia).

1.2. GELS D'AGAROSE EN PLAQUE

1. Une plaque de verre est placée horizontalement sur une plate-forme à niveau faite d'une pièce de Plexiglas mesurant 20 x 20 x 0.7 cm supportée par trois vis (deux du côté avant et une autre à l'arrière). Un peigne pour former les puits (maintenu à 2 mm au-dessus de la surface vitrée à l'aide d'une pince à trois griffes) est aligné parallèlement au sommet de la plaque de verre.

2. De l'agarose (pour électrophorèse) est préparé à une concentration finale de 0.5 à 1.5% en tampon Tris-acétate, Tris-phosphate ou Tris-borate.

3. La solution d'agarose fondu à la chaleur est refroidie à environ 50°C puis versée sur la plaque de verre à l'horizontale, en une ou deux étapes successives.

4. Après durcissement du gel, le peigne est enlevé et les échantillons (20 µL) sont déposés directement dans les puits pour électrophorèse.

5. Les cavités sont remplies de tampon pour éliminer les bulles d'air, et les gels sont couverts d'un film de plastique (Handiwrap, Dow Chemicals) pour prévenir leur assèchement au cours de l'électrophorèse.

Note: Pour obtenir des minigels d'environ 0.4 cm d'épaisseur verser 30 mL d'agarose sur des plaques de 10 x 7 cm (Bio-Rad). Les échantillons d'ADN sont légèrement réduits lorsque des gels miniatures sont utilisés.

Les grands gels (deux par unité d'électrophorèse, voir Figure 1) et les minigels (quatre par unité, voir Figure 2) sont utilisés à 50 V pendant 16 h et à 150 V pendant 90 min, respectivement, pour des résultats de qualité optimale (Figure 3). Le système assure des taux de migration équivalents dans tous les gels, grands ou petits. Un plus grand nombre d'échantillons peuvent être analysés dans une même période de temps en faisant l'électrophorèse dans des gels placés en série. La Figure 4 illustre comment deux paires de réservoirs à tampon peuvent être utilisés avec 50% plus de gels qu'à l'ordinaire, tout en ne monopolisant qu'une seule sortie du générateur de courant pendant l'électrophorèse. Les gels situés dans la partie médiane du "train" sont soutenus par des réservoirs sans électrode. Le voltage est ajusté selon le nombre de paires de gels utilisés en même temps. La Figure 5 illustre les résultats obtenus.

1.3. DISCUSSION

L'électrophorèse en gel d'agarose est devenue un outil indispensable à la cartographie physique et à l'analyse de génomes viraux, ainsi qu'au diagnostic rapide d'infections virales par la technologie des endonucléases de restriction. Deux types d'appareils à électrophorèse sont couramment utilisés pour la séparation de multiples échantillons en agarose: ceux qui emploient avec des gels verticaux et ceux qui utilisent des gels horizontaux. Des bandes d'ADN très minces sont normalement obtenues avec les gels verticaux, mais certains problèmes reliés à un manque d'adhérence de l'agarose sur les plaques de verre font que leurs équivalents à l'horizontale sont plus pratiques dans une variété d'applications.

L'on utilise ici un appareil à électrophorèse de construction facile qui permet la séparation de multiples échantillons d'ADN dans plusieurs gels à l'aide d'une seule source de tension. Cet appareil assure des taux de migration équivalents dans tous les gels pour comparer la mobilité relative des bandes d'ADN, et les résultats sont très semblables à ceux obtenus avec des systèmes de fabrication plus coûteuse ou relativement chers à l'achat. Jusqu'à présent, le système a été efficacement utilisé pour tester l'activité endonucléasique dans les fractions éluées de colonnes à chromatographie et dans des échantillons d'enzymes de restriction, de même que dans la préparation et l'analyse de fragments de restriction, la cartographie physique et l'hybridation moléculaire.

Un autre avantage marqué de ce système est sa polyvalence: (1) des gels dont la taille varie entre 2.5 x 7.5 cm et 28 x 30 cm sont couramment utilisés dans ce laboratoire; (2) la migration simultanée de molécules d'ADN dans des gels à haute ou basse concentration est également possible. Pratiques, économiques et éprouvés, les gels d'agarose miniatures sont d'utilisation courante pour sélectionner des clones de bactéries recombinantes, pour suivre une digestion d'ADN avec des endonucléases de restriction, pour surveiller une réaction de ligature ou un marquage des extrémités, et autres applications (Hamelin *et al.* 1986).

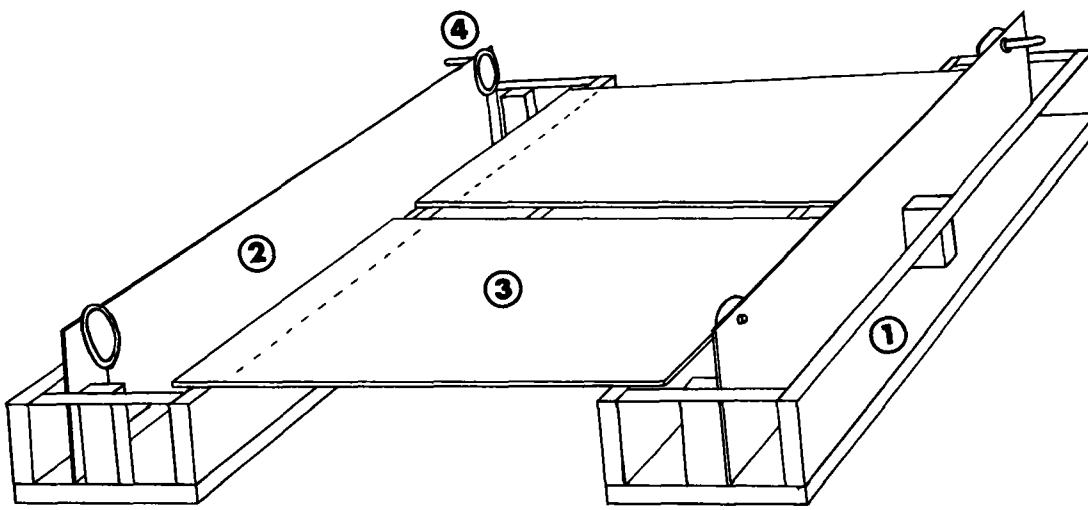


Figure 1

Schéma de l'appareil à électrophorèse utilisé pour gels d'agarose en plaque à l'horizontale: (1) chambre à tampon, (2) électrode amovible, (3) gel d'agarose, (4) prise menant au générateur de courant.

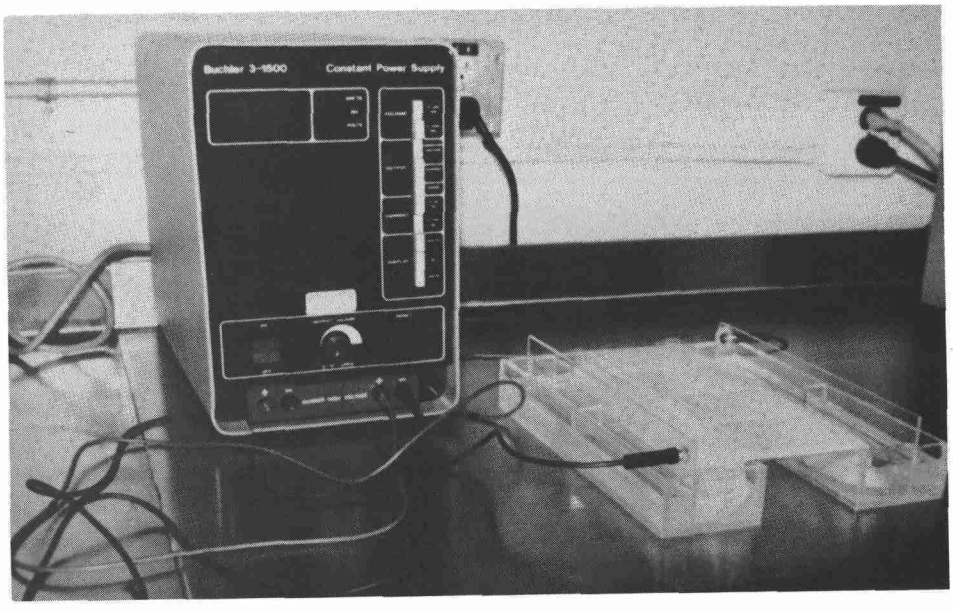


Figure 2

Gels d'agarose miniatures en position pour l'électrophorèse. Quatre minigels sont alignés sur le côté interne des chambres à tampon se faisant face. Une seule sortie du générateur de courant est utilisée pour tous les gels.

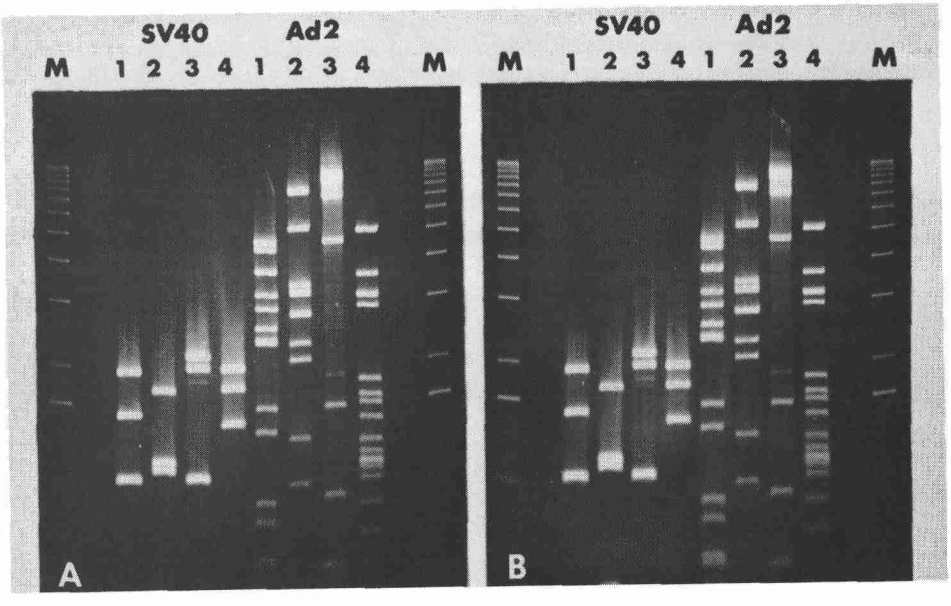


Figure 3

Fragments de restriction obtenus après digestion de l'ADN du virus simien 40 (SV40) et de l'adénovirus humain de type 2 (Ad2) avec les enzymes (1) *Hinc* II, (2) *Hind* III, (3) *Hpa* I et (4) *Pvu* II. L'électrophorèse des fragments d'ADN en agarose a été réalisée dans deux gels de grande taille tel qu'illustré dans la Figure 1 Les taux de migration sont équivalents pour les deux gels. L'échelle de 1 kilopaire de bases obtenue de GIBCO/BRL (M) a été utilisée comme mesure de taille.

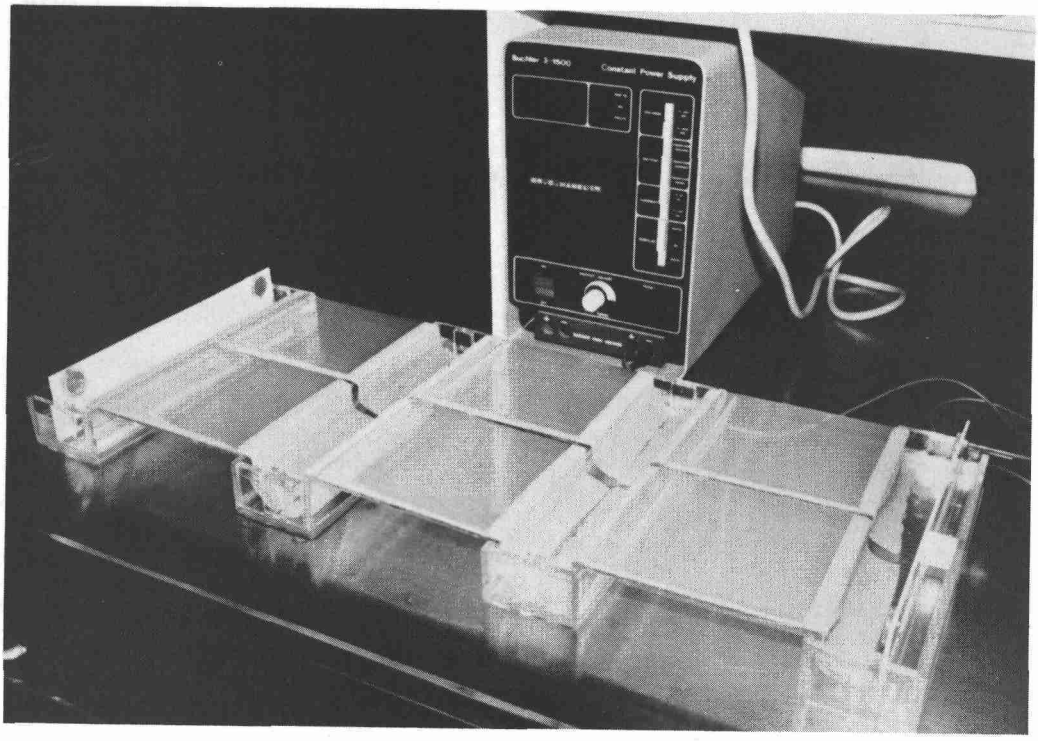


Figure 4

Six gels de grande taille utilisés en série. Des chambres à tampon sans électrodes soutiennent les gels dans la partie médiane du système à électrophorèse désigné sous le nom de "Chattanooga". Jusqu'à 20 gels ont été utilisés en série en employant plusieurs contenants en Plexiglas mais un seul générateur de courant.

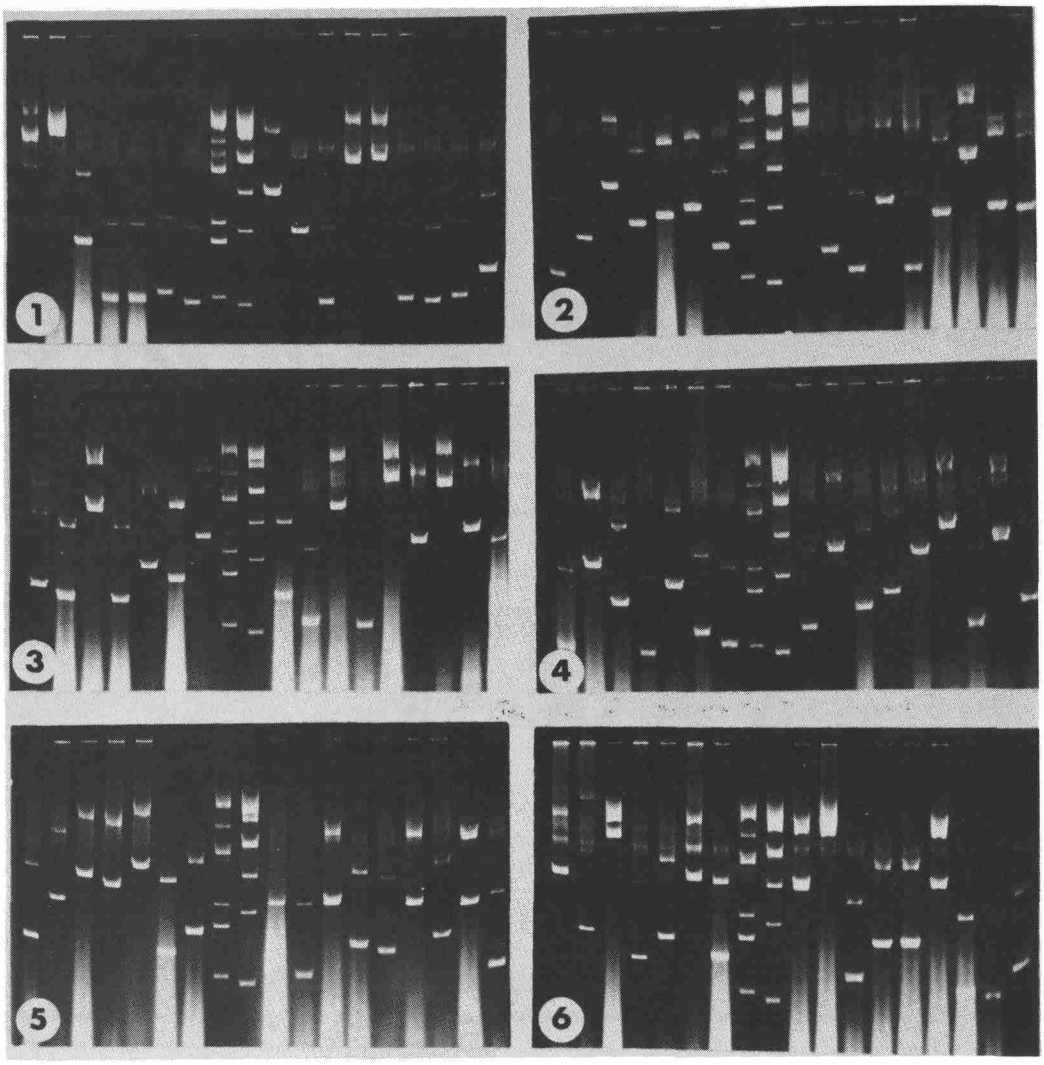


Figure 5

Analyse électrophorétique de plasmides pAT153 recombinants portant des fragments *Hin*d III du cytomégalovirus humain. Au total, 108 échantillons d'ADN ont simultanément été soumis à une électrophorèse de 4 h à 450 V dans six gels différents tel que montré dans la Figure 5. La bande d'ADN observée dans la partie inférieure des gels (colonne 9) contient pAT153 sans insertion. Tous les autres plasmides migrent plus lentement que le vecteur intact en agarose et contiennent donc au moins un fragment *Hin*d III de l'ADN du cytomégalovirus humain. Des marqueurs de taille migrant dans deux colonnes séparées au milieu de chaque gel mesurent respectivement 3.6, 3.9, 5.0, 8.9, 12.0 et 25.0 kilobases.

Culture cellulaire infectée avec effet cytopathique maximal

Obtenir un culot cellulaire par centrifugation à basse vitesse et resuspendre dans 1 mL

A 0.5 mL de cellules ajouter 40 µL de pronase (2 mg/mL) et 40 µL de SDS (10%) Incuber à 37°C

Extraire avec 2 vol. de phénol saturé, incuber, centrifuger

<-- **Phase aqueuse 1**

Phase phénolique -->

Extraire avec 0.5 vol. tampon TE, incuber, centrifuger

<-- **Phase aqueuse 2**

Phase phénolique -->

Pooler les phases1 et 2, extraire le phénol résiduel alcool isoamylique-chloroforme (1:24)

Centrifuger / séparer

Ajouter 0.1 vol. NaCl 5M
2.5 vol. éthanol (100%)
Précipitation de l'ADN 15 min -70°C
Centrifuger 10 min.

<-- Surnageant

<-- Culot d'ADN resuspendu dans 100 µL de tampon TE

Figure 6

Représentation schématique des étapes requises pour l'extraction de l'ADN viral

2. GÉNOTYPAGE

Les endonucléases de restriction clivent l'ADN double-brin en des sites de reconnaissance comprenant 4 à 6 nucléotides ordonnés de façon spécifique. L'électrophorèse des fragments oligonucléotidiques en agarose donne des patrons de digestion hautement spécifiques pour les souches et espèces virales. La méthode relativement simple décrite dans cette section peut servir au génotypage d'une grande variété de virus à ADN. L'analyse de souches d'herpès simplex de types 1 et 2 est donnée ici comme exemple.

2.1. INFECTION DES CELLULES

1. Cultiver des cellules Vero dans des flacons de 25 cm^2 (2.5 x 10^6 cellules), dans un milieu (10 mL) constitué de parties égales de Milieu Minimum Essentiel (MEM) (base saline de Earle) et de Milieu 199 (base saline de Hank) contenant 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 50 µg/mL de gentamicine.

2. Infecter les cellules confluentes avec 1 mL de virus pendant 1 h à 37°C. Ajouter 9 mL de milieu contenant 2% SVF, et incuber la culture à 37°C pendant 24 h ou jusqu'à ce que plus de 90% des cellules soient arrondies, plus grandes et réfringentes lors de l'observation au microscope.

3. Disperser les cellules infectées à l'aide d'une solution de trypsine et les recueillir dans 0.8 mL de saline tamponnée au phosphate (PBS). Répartir la suspension cellulaire à raison de 0.4 mL/tube dans des tubes coniques en polypropylène de 1.5 mL (Eppendorf) et sont congeler à –70°C ou utiliser immédiatement pour la préparation d'ADN viral. Les cellules infectées peuvent être gardées plusieurs semaines à –70°C sans perte d'ADN .

2.2. PRÉPARATION DE L'ADN

1. Extraire l'ADN du virus herpès simplex (HSV) des cellules infectées par traitement avec 1% de sodium dodécyl sulfate (SDS) et 0.2 mg/mL de pronase exempte de nucléases (Calbiochem) pendant 30 min à 37°C (Figure 6).

2. Ajouter deux volumes de phénol bidistillé tamponné avec 1/4 volume de tampon Tris HCl (10 mM, pH 7.4 et 1 mM EDTA) au tube puis mélanger doucement au Vortex.

3. Après une incubation de 10 min dans la glace, centrifuger les cellules traitées au phénol à 12 800 x *g* pour 1 min à la température ambiante dans une centrifugeuse Eppendorf modèle 5412.

4. Prélever aa phase aqueuse (couche supérieure) en évitant de toucher au matériel blanchâtre et floconneux à l'interface. Déposer dans un autre tube à centrifugation d'une capacité de 1.5 mL et récupérer l'ADN encore présent dans la phase phénolique par l'addition d'un demi-volume de tampon TE, mélanger et centrifuger le tout dans les mêmes conditions.

5. Regrouper les deux phases aqueuses et centrifuger pour éliminer le phénol résiduel (normalement une petite goutte au fond du tube à centrifugation).

6. Extraire la solution contenant l'ADN trois ou quatre fois avec un même volume de chloroforme et d'alcool isoamylique (24:1) ou, plus facilement, avec un mélange de phénol et de chloroforme (1:1) et plusieurs fois

avec du chloroforme seulement. À la fin de cette opération, aucun flocon blanchâtre ne devrait être observé à l'interface après centrifugation.

7. Transférer la phase supérieure dans un autre tube, et ajouter 0.1 volume de NaCl 5M et 2.5 volumes d'éthanol 100%. Précipiter les acides nucléiques pendant 15 min à –70°C (ou dans un bain contenant de l'éthanol et de la glace sèche) et centrifuger pendant 10 min.

8. Laver le culot final (environ la taille d'une tête d'épingle) avec de l'éthanol 75%. Sécher, puis dissoudre dans 100 µL de tampon TE. À cette étape, la solution d'ADN peut être gardée à 4°C ou congelée à –70°C pour analyse ultérieure.

2.3. CLIVAGE ET ÉLECTROPHORÈSE

1. Pour l'analyse de restriction avec les endonucléases, 2 à 15 µL d'ADN en solution, mettre en présence de 5 à 10 unités d'enzymes de restriction (Boehringer Mannheim, GIBCO/BRL, New England Biolabs, Pharmacia) dans un mélange réactionnel totalisant 25 µL. Les conditions de tampon et de température sont celles recommandées par les producteurs d'enzymes.

2. Incuber 1 à 2 h à la température requise puis, arrêter la réaction par l'addition de 3 µL d'une solution contenant 5% de SDS, 25% de saccharose et 0.05% de bromophénol.

3. Charger l'ADN digéré sur un gel d'agarose 1% préparé dans 90 mL de tampon TBE (Tris base 0.1 M, acide borique 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 8.3).

4. Effectuer l'électrophorèse des produits de digestion à 50 V pendant 16 h.

5. Après l'électrophorèse, colorer les gels avec 1 µg/mL de bromure d'éthidium pendant 30 min. Mettre en évidence les bandes d'ADN dans le gel par illumination directe avec des rayons ultraviolets courts (trans-illuminateur modèle C–61, Ultraviolet Products) et photographier avec un film Polaroid Type 107 au travers d'un filtre rouge Kodak Wratten 23A.

2.4. RÉSULTATS

Les résultats de la Figure 7 illustrent comment des souches des virus HSV–1 et HSV–2 peuvent être identifiées de façon non ambiguë en se basant sur des différences spécifiques et claires entre marqueurs d'ADN. La détection de changements mineurs dans les patrons de digestion d'isolats viraux des deux types est également possible après digestion des molécules d'ADN avec différentes endonucléases de restriction (Figure 3). En utilisant la même méthode et les mêmes réactifs, il est également possible d'identifier d'autres virus à ADN (Figure 9). Dans chacun des cas, un patron d'ADN typique est obtenu, lequel peut être utilisé pour distinguer des espèces virales rapprochées ou distinctes.

3. DISCUSSION

De l'ADN viral assez pur et en quantité suffisante pour permettre de multiples digestions avec des endonucléases de restriction a jusqu'à présent été obtenu de cellules aviaires, bovines, canines, humaines, simiennes et murines infectées par différentes espèces d'adénovirus et d'herpèsvirus. Une contamination excessive des préparations d'ADN viral avec de l'ADN cellulaire (traînée blanchâtre ou

bandes pâles apparaissant à intervalles réguliers dans l'arrière-plan) ou avec de l'ARN (matériel à migration rapide à la base du gel) est prévenue en utilisant pour l'infection, des cellules transformées (e.g., CMT–93, MDCK, Vero, etc.) obtenues de l'American Type Culture Collection plutôt que des cellules en culture primaire. Seulement des cultures jeunes (en pleine croissance) sont infectées avec le virus. Isolats cliniques et souches du champ sont propagés une ou deux fois sur cellules permissives avant d'être utilisés et ce, afin d'augmenter le titre initial du virus. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des virus produisant des effets cytopathiques 4+ en moins de 5 jours. L'incubation à 37°C dure tant que les cellules infectées restent attachées à la paroi de plastique. Il faut, en d'autres termes, essayer d'obtenir le plus de copies possible du génome viral sans toutefois détruire la cellule et briser son ADN. Dans ce contexte, l'utilisation du Vortex doit être limitée au strict minimum pendant l'extraction de l'ADN.

La quantité d'ADN viral récupéré d'un seul flacon de 25 cm^2 d'une culture de cellules infectées dépasse, dans ces conditions, ce qui est requis pour l'identification certaine et le typage par analyse de restriction. Les fragments produits lors du clivage des molécules d'ADN par les enzymes de restriction sont facilement localisés dans les gels après coloration au bromure d'éthidium. Des différences dans le nombre et la taille des fragments de restriction permettent la séparation entre espèces virales reliées ou distinctes. De la variation intratypique peut également être détectée entre souches d'adénovirus et d'herpèsvirus lorsqu'une batterie de 4 à 8 enzymes de restriction est utilisée. Les cultures cellulaires à grande échelle, une manipulation prudente de produits radioactifs et/ou une préparation longue et laborieuse d'extraits cytoplasmiques, de nucléocapsides ou d'ADN viral libre sont éliminés par notre méthode d'empreinte de l'ADN.

Une centaine d'endonucléases de restriction sont présentement disponibles sur le marché. Quand seulement un petit nombre de fragments de restriction sont requis pour l'identification correcte d'un virus, son génome sera préférentiellement clivé avec des enzymes qui reconnaissent des séquences hexanucléotidiques riches en AT (i.e., *Aha* III ou *Dra* I). Si plus de fragments d'ADN doivent être comparés pour différencier, par exemple, une souche vaccinale d'une souche isolée sur le terrain, des endonucléases de restriction telles que *Msp* I (C/CGG) seront utilisées. Les ADN d'adénovirus et d'herpèsvirus sont caractérisés par un contenu en GC relativement élevé et un plus grand nombre de bandes pourraient être obtenues. Maintenant, le génome cellulaire est fortement méthylé et des enzymes de restriction sensibles à la méthylation pourraient, en certaines occasions, être employées pour réduire les traînées d'ADN dans le gel. Il existe, en fait, des endonucléases de restriction pour répondre à la plupart de nos besoins. Des fragments nombreux et bien distribués entre 1 et 12 kilobases sont habituellement recherchés. Une digestion incomplète des molécules d'ADN pouvant semer de la confusion peut être évitée en utilisant un excès d'enzyme (± 10 unités/µg d'ADN).

L'analyse de l'ADN par les endonucléases de restriction constitue une méthode puissante pour établir des liens entre virus au niveau génomique. Cette technique a été utilisée avec succès pour l'identification de souches d'adénovirus et d'herpèsvirus qui pouvaient difficilement ou ne pouvaient pas être différenciées par d'autres moyens. De nouvelles espèces d'adénovirus ont été découvertes

en utilisant notre méthode simplifiée d'empreinte de l'ADN. L'analyse d'ADN par les endonucléases de restriction est assurément la méthode de choix pour mesurer les associations naturelles entre micro-organismes apparentés.

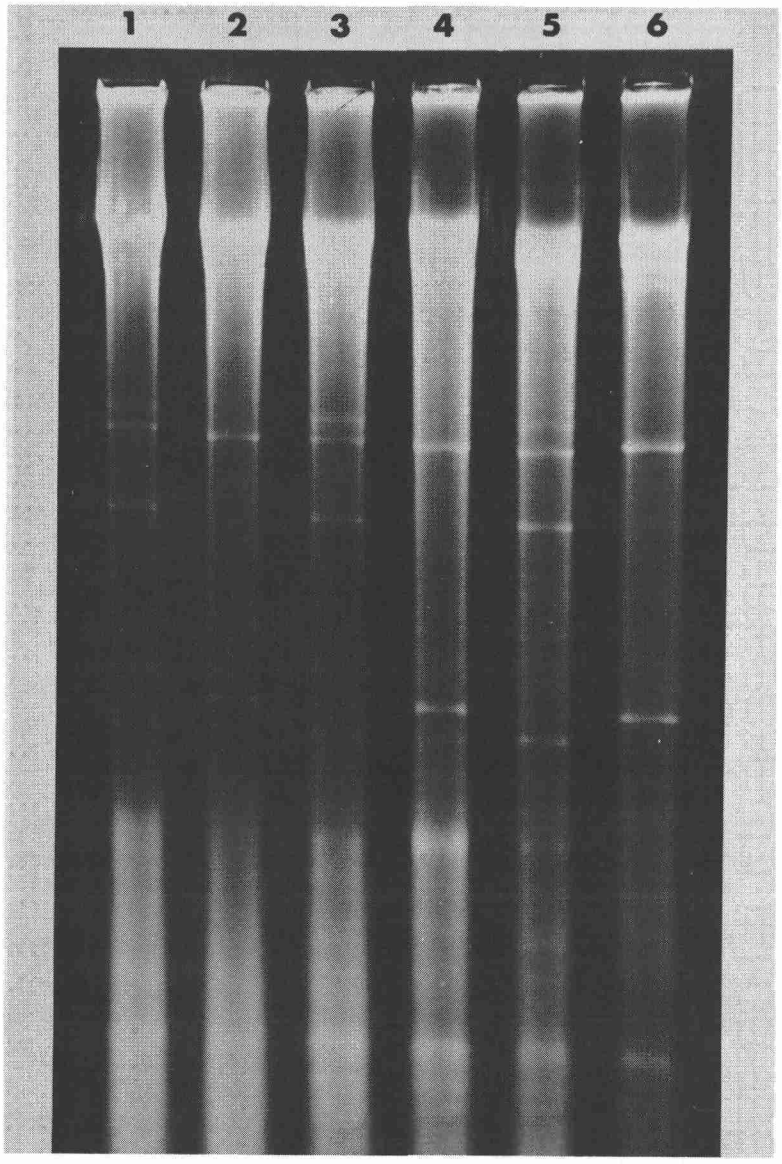


Figure 7

Patrons électrophorétiques de l'ADN extrait de souches du virus herpès simplex de type 1 (1, 3, 5) et de type 2 (2, 4, 6) après clivage avec l'endonucléase de restriction *Eco*R I. Les fragments HSV–1 K, L, M et N avec des masses moléculaires respectives de 3.5, 3.3, 2.7 et 1.5 MDa et les fragments HSV–2 M et N avec des masses moléculaires respectives de 3.3 et 1.6 MDa sont facilement observés dans le gel et permettent l'identification non-ambiguë des souches virales. L'analyse de restriction par endonucléases s'ajoute avec profit aux techniques biologiques et immunologiques déjà utilisées dans les laboratoires de diagnostic pour distinguer les isolats HSV–1 et HSV–2.

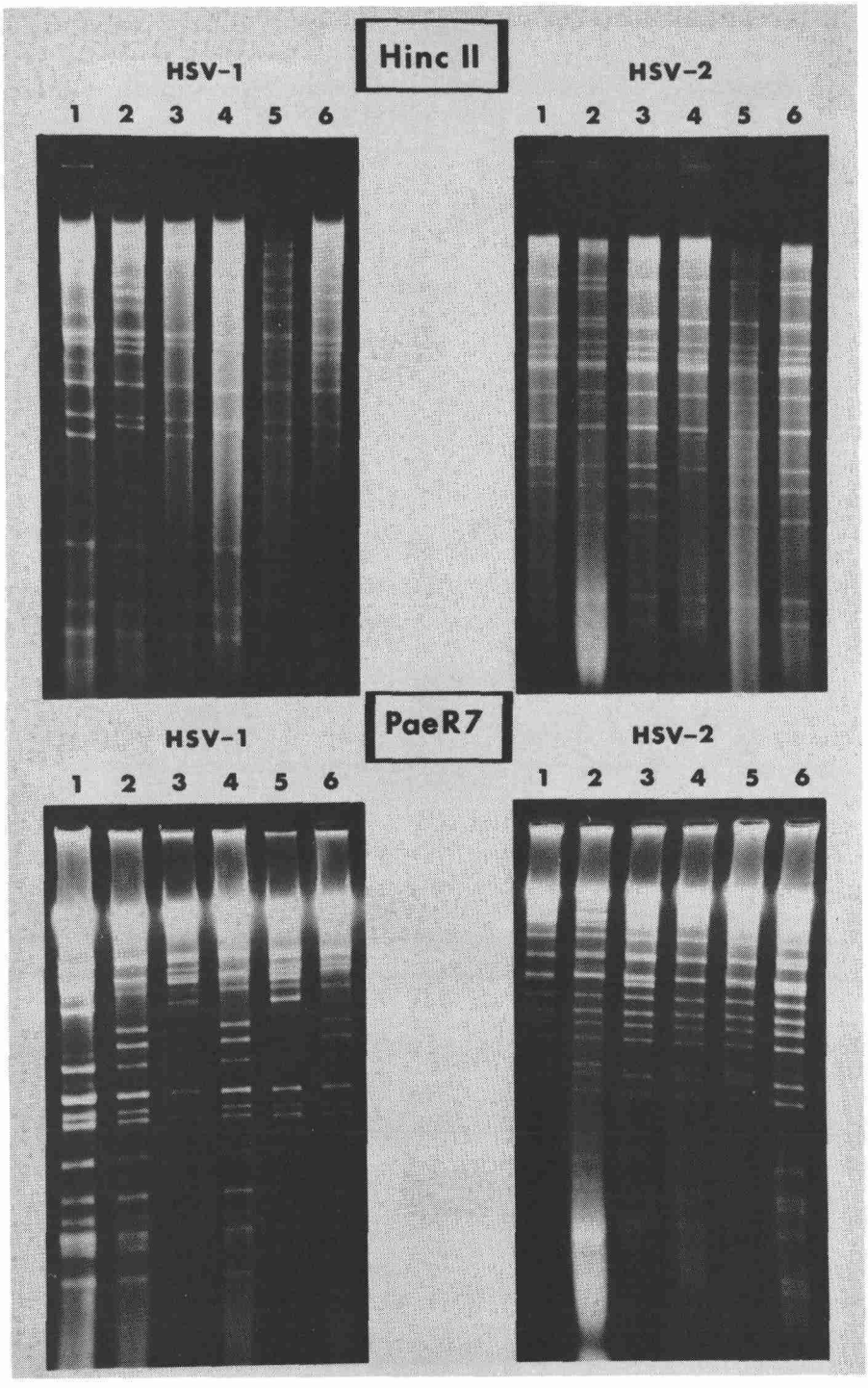


Figure 8

Profils de restriction *Hinc* II et *Pae*R7 de souches HSV–1 et HSV–2. Des différences fines dans le nombre et la taille des fragments d'ADN peuvent être observées entre souches de même type. La variation intratypique détectée par empreinte de l'ADN peut s'avérer d'un grand intérêt en épidémiologie.

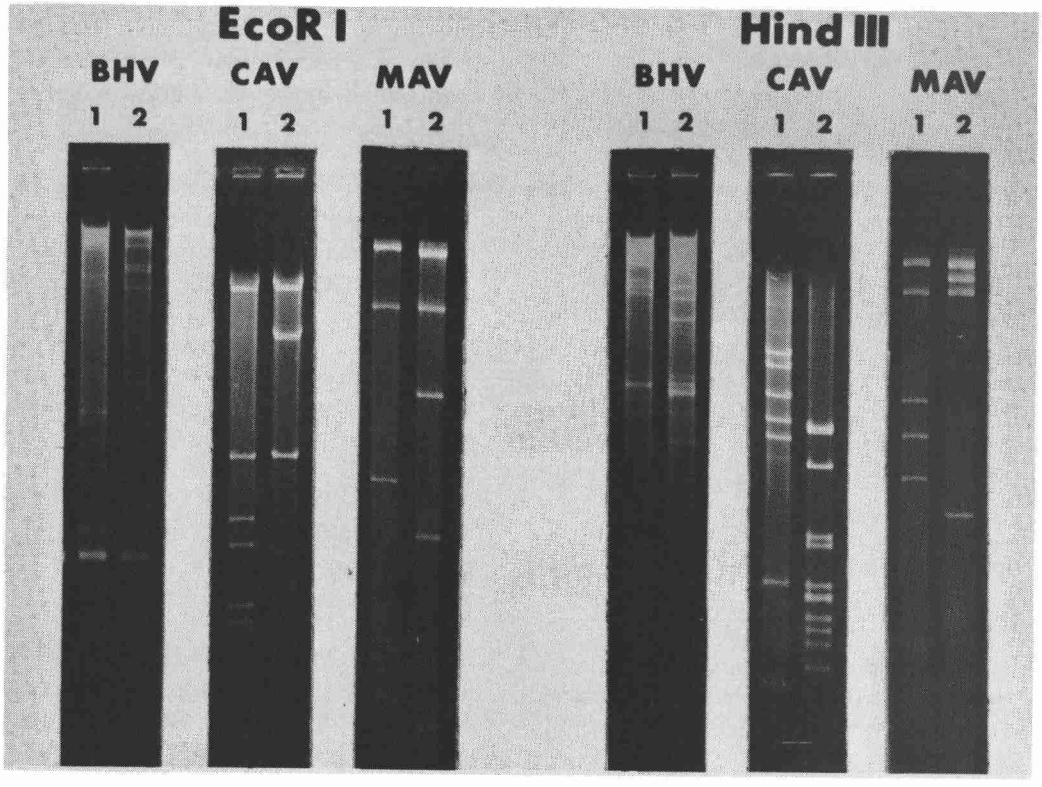


Figure 9

Profils de restriction de souches d'herpèsvirus bovin (BHV), d'adénovirus canin (CAV) et d'adénovirus murin (MAV) de deux types. Les mêmes tampons et réactifs ont été utilisés pour l'identification des différents virus. Seul un petit nombre de fragments *Eco*R I ou *Hin*d III comigrant en agarose sont retrouvés dans les profils apparentés. Une telle absence d'homologie de séquence peut être employée, au niveau de leur taxonomie, pour faire accepter l'unicité d'espèces virales jusqu'alors confondues.

4. RÉFÉRENCES

Andrews, A.T. 1986. *Electrophoresis: Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications*, 2nd Edition. Monographs on Physical Biochemistry, Oxford Science Publications, Clarendon Press, Oxford. 452 pages.

Assaf, R., Marsolais, G., Yelle, J. et Hamelin, C. 1983. Unambiguous typing of canine adenovirus isolates by deoxyribonucleic acid restriction-endonuclease analysis. Can. J. Comp. Med. 47: 460-463.

Belloncik, S., Lavallée, C. et Hamelin, C. 1986. Relative pathogenicity of nuclear polyhedrosis viruses from *Mamestra brassicae, Euxoa messoria, Agrotis segetum, Autographa california*, and *Heliothis* spp. for larvae of *Euxoa scandens* (Leidoptera: *Noctuidae*). J. Invert. Pathol. 47: 8-11.

Boffe, S.A. 1984. Agarose gel electrophoresis of DNA. Meth. Mol. Biol. 2:43-50.

Davis, L.G., M.D. Dibner et J.F. Battey 1986. *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, New York, 388 pages.

Hamelin, C. 1980. A simple electrophoresis system for multiple agarose slab gels. Anal. Biochem. 108: 207-211.

Hamelin, C., Chagnon, A. et Fauvel, M. 1984a. Identification of atypical strains of herpes simplex virus using a simplified DNA fingerprinting method. Microbiol. Immunol. 28: 723-729.

Hamelin, C., Dion, M. et Yelle, J. 1984. Analysis of recombinant plasmids using multiple agarose slab gels in series. Gene Anal. Techn. 1: 79-83.

Hamelin, C., Jouvenne, P., et Assaf, R. 1986. Genotypic characterization of type-2 variants of canine adenovirus. Am. J. Vet. Med. 47: 625-630.

Hamelin, C., Marsolais, G. et Assaf, R. 1984. Interspecific differences between the DNA restrictions profiles of canine adenoviruses. Experientia 40: 482.

Hamelin, C., Yelle, J. et M. Dion. 1986. Fast electrophoresis in superposed agarose minigels for DNA topoisomerase assays. Electrophoresis 7: 323-326.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 545 pages.

Roizman, B. et Tognon, M. 1983. Restriction endonuclease patterns of herpes simplex virus DNA: Application to diagnostic and molecular epidemiology. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 104: 273-286.

Schleif, R.F. et Wensink, P.C. 1981. *Practical Methods in Molecular Biology*. Springer–Verlag, New York. 220 pages.

Sealey, P.G. et Southern, E.M. 1982. Gel electrophoresis of DNA. Dans *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A practical Approach*. IRL Press Ltd, Oxford, pages 39–76.

24

EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX

Patricia Jouvenne et François Fossiez

1. INTRODUCTION

L'étude moléculaire des virus nécessite la purification des acides nucléiques viraux, qu'il s'agisse d'ADN génomique, d'ARN génomique ou d'ARN messager (ARNm). Les ADN génomiques sont ensuite directement clonés dans un vecteur plasmidique, tandis que les ARN génomiques et les ARNm doivent préalablement être transcrits en ADN complémentaires (ADNc). Après le clonage, les plasmides recombinants sont produits et purifiés en quantité appréciable pour fin d'analyse (cartographie physique, hybridation, séquençage, etc.).

Dans ce chapitre, nous décrirons les diverses techniques d'extraction des acides nucléiques permettant d'isoler:

- les génomes à partir de virus purifiés,
- les ARNm provenant de cellules infectées
- et les plasmides recombinants.

2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX

2.1. EXTRACTION DES GÉNOMES À PARTIR DE VIRUS PURIFIÉS

Toutes les techniques ont le même but: séparer les protéines des acides nucléiques viraux. Pour ce faire, on utilise généralement des centrifugations en gradient de chlorure de césium (CsCl) ou de sulfate de césium (Cs_2SO_4). La compagnie Pharmacia a mis sur le marché un autre sel de césium, le trifluoroacétate de césium (CsTFA) qui est vendu sous la forme d'une solution aqueuse d'une densité approximative de 2 g/ $cm^{3,}$ et qui présente plusieurs avantages:

- L'ADN et l'ARN forment des bandes distinctes en gradient de CsTFA, les protéines flottant à la surface.
- Il dénature fortement les protéines qui se dissocient alors des acides nucléiques. Cette propriété élimine les étapes d'extraction précédant les gradients de CsCl ou de Cs_2SO_4

- Grâce à ses propriétés dénaturantes, le CsTFA inactive également les nucléases.

- Enfin, les acides nucléiques peuvent être récupérés par une simple précipitation à l'éthanol sans qu'il soit nécessaire de dialyser le milieu de centrifugation.

Méthode

1. Préparation de l'échantillon: en présence de césium, le dodécyl sulfate de sodium forme des sels insolubles qui doivent être éliminés de la préparation virale. Une alternative consiste à utiliser un détergent compatible avec le CsTFA, comme le N-lauroyl sarcosinate de sodium.

2. Préparation des gradients: afin de préparer correctement les gradients de CsTFA, il est important d'estimer la densité de l'acide nucléique à purifier (voir Tableau 1). Dans le cas des virus possédant un génome d'ARN bicaténaire (bc), ce dernier migre à une densité voisine de celle de l'ADN bc.

Tableau 1

Densité des acides nucléiques et des protéines dans le CsTFA

ADN	1.60 - 1.63 g/cm^3
ARNm	1.83 - 1.90 g/cm^3
Protéines	1.20 - 1.50 g/cm^3

Précautions

- Ne pas utiliser de tubes en nitrate de cellulose.

- Diluer le CsTFA avec des tampons normalement utilisés pour conserver les acides nucléiques (par exemple: Tris HCl 0.1 M (pH 7.5), KCl 0.1 M, EDTA1 mM).

- Diluer le CsTFA à la densité estimée de l'acide nucléique. La méthode idéale consiste à mélanger la totalité de l'échantillon avec le CsTFA afin d'optimiser la dénaturation des protéines et l'inactivation des nucléases (pendant l'ultracentrifugation, le CsTFA formera un gradient dans lequel les acides nucléiques se regrouperont en une bande isopycnique).

- Pour obtenir une solution de CsTFA de densité voulue, calculer le volume de tampon et d'échantillon à employer à l'aide de la formule suivante:

$$V_x = \frac{V_o(\rho_o - \rho)}{(\rho - \rho_x)}$$

où V_x = volume de tampon de dilution (mL)

V_o = volume de la solution originale de CsTFA (mL)

ρ_o = densité de la solution originale de CsTFA (g/cm^3)

ρx = densité du tampon de dilution (g/cm^3)

ρ = densité voulue de la solution diluée de CsTFA (g/cm^3)

3. Conditions de centrifugation: les conditions typiques de centrifugation sont de 100 000 x *g* pendant 36 à 72 h. La température recommandée

se situe entre 4°C et 25°C (la déprotéinisation est d'autant plus efficace que la température de centrifugation est élevée).

4. Fractionnement des gradients: étant donné que les protéines flottent à la surface du gradient, il est recommandé de récolter les fractions par le bas du tube afin d'éviter toute contamination des acides nucléiques.

5. Mesure de la densité de chaque fraction. Il existe deux façons de mesurer la densité des fractions:

- Peser 100 µL de chaque fraction à l'aide d'une balance analytique. Cette technique permet de récupérer la totalité de l'échantillon.

- Mesurer l'indice de réfraction et déduire la densité à l'aide de l'équation suivante:

$$\rho^{25} = 163.559 - 262.271\ (\eta_D^{25}) + 105.281\ (\eta_D^{25})$$

où ρ^{25} = densité du CsTFA à 25°C

η_D^{25} = indice de réfraction à 25°C

6. Détermination de la concentration en acides nucléiques. Le CsTFA absorbe peu les rayonnements UV permettant ainsi la détection des acides nucléiques à 260 nm. Quand $A_{260} = 1$, la concentration est de 50 ug/ mL pour l'ADN bicaténaire (bc) et l'ARNbc et de 40 ug/ mL pour l'ADN monocaténaire (mc) et l'ARNmc.

Bien que les gradients de CsTFA constituent la méthode la plus pratique pour purifier les génomes viraux, elle ne peut s'appliquer à tous les virus à ARN. En effet, dans certains cas, des polyribosomes sont co-purifiés avec les particules virales et des ARN ribosomaux contaminent les préparations d'ARN génomique au cours de l'extraction. Pour éviter cette contamination, les nucléocapsides virales doivent être purifiées sur un gradient de saccharose avant l'extraction des acides nucléiques.

2.2. EXTRACTION DES ARNm VIRAUX

Certains virus inhibent fortement les transcriptions cellulaires permettant l'extraction d'ARNm viraux en grande quantité. Lorsque la production des messagers viraux est insuffisante, il est possible d'optimiser leur synthèse en bloquant les transcriptions cellulaires à l'aide de l'actinomycine D.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des ARN cellulaires et viraux. L'une d'entre elles utilise le guanidinium isothiocyanate qui, à l'aide d'agents réducteurs, présente l'avantage d'inactiver efficacement les ribonucléases tout en lysant les cellules (Chirgwin *et al.* 1979). Les ARN sont ensuite séparés des ADN et des protéines dans un gradient de chlorure de césium (Glisin *et al.* 1974). Enfin, les ARN polyadénylés sont sélectionnés par chromatographie d'affinité à l'aide d'une colonne de cellulose-oligo(dT) (Aviv et Leder 1972) ou d'une colonne de Sepharose-poly(U) (Shapiro et Schimke 1975). Cette étape permet d'obtenir une préparation d'ARNm dont la pureté assure la qualité des résultats dans les expériences subséquentes (électrophorèse, traduction *in vitro*, synthèse d'ADNc, hybridation, etc.).

Quel que soit le but de la manipulation des ARN, la précaution majeure à prendre est d'éviter l'activité ribonucléasique. Toute la vaisselle en verre doit être passée dans un four Pasteur à 250°C pendant 4 h ou bien traitée à l'aide de l'acide sulfochromique, puis autoclavée. Le port

des gants est indispensable pour toute manipulation.

2.2.1. Extraction des ARN cellulaires et viraux

1. Déterminer le temps post-infection où la synthèse des ARNm viraux est maximale (à l'aide d'une cinétique d'incorporation de l'uridine [^{3}H]).

2. Laver le feuillet cellulaire avec du tampon phosphate de Dulbecco glacé et recueillir les cellules infectées.

3. Centrifuger les cellules à 1000 x *g* pendant 10 min à 4°C.

4. Au culot cellulaire, ajouter 5 volumes de la préparation suivante:

   Guanidinium isothiocyanate .....4 M

   Citrate de sodium (pH 7).....5 mM

   β-mercaptoéthanol .....0.1 M

   Dodécyl sarcosinate de sodium...0.5%

5. À l'aide d'un homogénéisateur de type Dounce, homogénéiser la suspension cellulaire jusuq'à ce que toutes les cellules soient brisées (vérifier par microscopie).

6. Ajouter 0.25 g de CsCl par mL d'homogénat.

7. Déposer l'homogénat sur un coussin de 2 à 3 mL de CsCl 5.7 M dans de l'EDTA 0.1 M (pH 8).

8. Centrifuger à 150 000 x *g* pendant 12 h à 20°C. En CsCl, la densité des ARN est plus grande que celle des ADN et des protéines. Durant la centrifugation, les ARN se retrouvent au culot tandis que protéines et ADN flottent au-dessus.

9. Jeter le surnageant, sécher les parois du tube et dissoudre le culot dans le tampon d'extraction: Tris-HCl 10 mM (pH 7.4), EDTA 5 mM, SDS 1%.

10. Extraire les acides nucléiques à l'aide de 2 volumes du mélange chloroforme-n-butanol (4:1). Conserver la phase aqueuse.

11. Réextraire la phase organique en ajoutant un volume égal de tampon d'extraction.

12. Rassembler les deux phases aqueuses et ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 2.5 volumes d'éthanol. Précipiter les ARN 2 fois à -20°C durant 2 à 24 h.

13. Conserver les ARN à –70°C dans l'éthanol 70%.

2.2.2. Sélection des ARN poly(A)$^+$ sur colonne de cellulose–oligo(dT)

1 Équilibrer le gel de cellulose–oligo(dT) avec le tampon de chargement stérile contenant: 20 mM Tris 20 mM, HCl (pH 7.6), chlorure de lithium (LiCl) 0.5M, EDTA 1 mM et SDS 0.1%

2. Préparer une colonne contenant 1 mL de gel dans une pipette Pasteur ou une colonne à usage unique (Econo-column, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Californie).

3. Laver la colonne avec 3 volumes de chacune des solutions suivantes:

   a. Eau stérile

   b. NaOH 0.1 M et EDTA 5 mM

   c. Eau stérile

4. Vérifier que le pH de l'éluat soit inférieur à 8.

5. Laver la colonne avec 5 volumes de tampon de chargement.

6. Dissoudre les ARN dans de l'eau stérile et les dénaturer à la chaleur (65°C pendant 5 min). Ajouter un volume égal de tampon de chargement 2X et laisser refroidir dans un bain de glace.

7. Déposer l'échantillon sur la colonne. Recueillir l'éluat, chauffer à nouveau (65°C pendant 5 min) et appliquer sur la colonne.

8. Laver la colonne avec 5 à 10 volumes de tampon de chargement, suivis de 4 volumes du même tampon contenant 0.1 M LiCl.

9. Éluer les ARN poly(A)$^+$ à l'aide de 2 ou 3 volumes de la solution stérile: Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, SDS 0.05%.

10. Ajouter 0.1 volume d'acétate de sodium 3 M (pH 5.2) et 2.5 volumes d'éthanol. Précipiter les ARN à –20°C pendant un minimum de 2 h.

11. Laver le culot avec quelques gouttes d'éthanol 70% et suspendre les ARN dans de l'eau stérile.

12. Par spectrophotométrie, déterminer la concentration et la pureté des ARNm. Quand A_{260} = 1, la concentration des ARNm est approximativement de 40 µg/mL. Quand AS $\frac{260}{280}$ = 2, la préparation d'ARNm est pure. Une valeur inférieure indique la présence de protéines.

2.2.3. Discussion

Malgré une perte d'ARNm au cours de la chromatographie, il est recommandé de sélectionner et d'enrichir la préparation en ARN polyadénylés afin d'obtenir des résultats de qualité.

2.3. EXTRACTION DES PLASMIDES RECOMBINANTS PAR LYSE ALCALINE

La technique d'extraction des ADN plasmidiques comporte trois étapes: croissance des bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) recombinantes, récolte et lyse des bactéries, séparation de l'ADN plasmidique du matériel génétique bactérien.

1. Selon la quantité de plasmides recombinants désirée, cette méthode sera appliquée à un petit volume de culture (1 mL) ou à un grand volume (100 mL à 1 L). En général, 1 mL de culture fournit 2 à 3 µg de plasmides, ce qui est suffisant pour déterminer la taille de l'insertion et/ou effectuer une réaction de séquençage plasmidique. Toutefois, si l'on désire une plus grande quantité (1 à 2 mg/L de culture), on peut "amplifier" la production plasmidique à l'aide du chloramphénicol (Maniatis *et al.* 1982). En inhibant les synthèses protéiques, cet antibiotique favorise la réplication des plasmides de type relâché.

2. Afin de relarguer l'ADN plasmidique, les parois bactériennes sont digérées à l'aide de lysozymes, puis la lyse est complétée par un traitement au SDS et au NaOH.

3. Le volume de NaOH ajouté à la suspension bactérienne est critique car on désire obtenir un pH 12–12.5.

C'est pourquoi la lyse bactérienne est effectuée en présence de glucose qui sert de tampon. Dans ces conditions, seul l'ADN chromosomique bactérien est dénaturé, tandis que l'ADN plasmidique reste intact. Quand le lysat est ensuite neutralisé à l'aide d'une solution d'acétate de potassium, l'ADN chromosomique forme des agrégats insolubles et les plamides restent en solution. Simultanément, la forte concentration d'acétate de potassium provoque la précipitation de complexes protéines-SDS et des ARN de haute masse moléculaire. L'ADN plasmidique se retrouve dans le surnageant avec les ARN de transfert et ribosomaux. Ces derniers sont éliminés à l'aide de la ribonucléase A. Les nucléases et les protéines résiduelles sont extraites à l'aide du phénol et du chloroforme et les plasmides sont récoltés par précipitation à l'éthanol.

L'ADN plasmidique ainsi obtenu est suffisamment pur pour être digéré par des endonucléases de restriction ou séquencé directement.

2.3.1. Extraction plasmidique à partir d'un petit volume de culture

Solutions

Milieu LB (Luria-Bertani):

Bacto-Tryptone ..... 10 g

Extrait de levure ..... 5 g

NaCl ..... 10 g

H_2O ..... 700 mL

Ajuster à pH 7.5 avec une solution de NaOH 1N. Compléter à 1 L avec de l'eau. Autoclaver pendant 20 min.

Acétate de potassium 3 M(pH 4.8):

Acétate de potassium 5 M ..... 60 mL

Acide acétique glacial ..... 11.5 mL

H_2O tridistillée. ..... 28.5 mL

Ribonucléase A (200 µg/mL) exempte de désoxyribonucléases

Préparer une solution contenant 200 µg/mL de ribonucléase A. Incuber dans un bain-marie à 100°C pendant 10 min afin d'inactiver les désoxyribonucléases.

Tampon TE (pH 8)

Tris-HCl (pH 8) ..... 10 mM

EDTA (pH 8) ..... 1 mM

Phénol-chloroforme

Utiliser une qualité de phénol redistillé pour la biologie moléculaire. Faire fondre à 68°C. Ajouter 0.1 % d'hydroxyquinoline (un antioxydant). Saturer le phénol avec un volume égal de Tris 1 M (pH 8) puis avec du Tris 0.1 M (pH 8) contenant 0.2% de β-mercaptoéthanol jusqu'à ce que la phase aqueuse atteigne un pH supérieur à 7.6. Préparer une solution contenant 24 parties de chloroforme pour 1 partie d'alcool isoamylique, puis mélanger 1 partie de phénol saturé avec 1 partie de chloroforme-alcool isoamylique.

Méthode

1. Inoculer 1.5 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié avec une colonie recombinante. Incuber à 37°C pendant 1 nuit avec agitation (250 rpm).

2. Transvaser 1.5 mL de culture dans un tube Eppendorf. Centrifuger à 12 800 x *g* pendant 1 min.

3. Jeter le surnageant et resuspendre le culot bactérien dans 200 µL d'une solution fraîchement préparée contenant: glucose 50 mM, EDTA 10 mM, Tris–HCl 25 mM (pH 8), 5 mg/mL lysozyme.

4. Incuber à la température de la pièce pendant 5 min.

5. Ajouter 200 µL d'une solution fraîche de 0.2 N NaOH et 1% SDS. Mélanger en inversant le tube; ne pas utiliser un agitateur mécanique. Laisser dans un bain de glace pendant 5 min.

6. Ajouter 150 µL d'une solution glacée d'acétate de potassium 3 M pH 4.8. Mélanger les tubes en position inversée à l'aide d'un Vortex, puis laisser dans la glace pendant 5 min.

7. Centrifuger à 12 800 x *g* pendant 15 min dans une centrifugeuse Eppendorf.

8. Transférer le surnageant dans un nouveau tube.

9. Ajouter 50 µL de ribonucléase A (200 µg/ mL) exempte de désoxyribonucléases. Incuber à 37°C pendant 30 min.

10. Ajouter 800 µL de phénol-chloroforme et mélanger à l'aide d'un Vortex pendant 30 sec. Centrifuger à 12 800 x *g* pendant 2 min et transférer le surnageant dans un tube Eppendorf.

11. Ajouter 2 volumes d'éthanol absolu, mélanger brièvement à l'aide d'un Vortex et incuber à la température de la pièce pendant 2 min.

12. Centrifuger à 12 800 x *g* pendant 10 min.

13. Jeter le surnageant et laver délicatement le culot avec de l'éthanol 70 %.

14. Sécher le culot dans une centrifugeuse sous vide.

15. Resolubiliser le culot dans 50 µL de tampon TE.

16. Digérer 5 µL de la préparation plasmidique à l'aide d'une endonucléase de restriction et analyser le résultat par électrophorèse en gel d'agarose (voiur Chapitre 23).

2.3.2. Extraction plasmidique à partir d'un grand volume de culture: amplification des plasmides

1. Inoculer 10 mL de milieu LB (voir section 2.3.2) contenant l'antibiotique approprié avec une colonie bactérienne recombinante. Incuber à 37°C pendant une nuit avec agitation (250 rpm).

2. Le lendemain matin, inoculer 25 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié avec 0.1 mL de la culture d'une nuit. Incuber à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à ce que la culture atteigne la phase logarithmique tardive.

3. Inoculer 25 mL de la culture en phase logarithmique tardive dans 500 mL de milieu LB préchauffé à 37°C et contenant l'antibiotique approprié. Incuber à 37°C pendant 2.5 h avec agitation (250 rpm).

4. Ajouter 2.5 mL de chloramphénicol (34 mg/ mL d'éthanol 70%). La concentration finale dans la culture sera de 170 µg/ mL.

5. Trente minutes après l'addition du chloramphénicol, diminuer l'agitation à 100 rpm et incuber pendant 16 h.

6. Centrifuger les bactéries à 4000 x *g* pendant 10 min à 4°C et jeter le surnageant.

7. Resuspendre le culot bactérien dans 10 mL d'une solution fraîchement préparée contenant: glucose 50 mM, Tris–HCl 20 mM (pH 8), EDTA 10 mM, lysozyme 5 mg/ mL. Incuber à la température de la pièce pendant 5 min.

8. Ajouter 20 mL d'une solution fraîche contenant NaOH 0.2 N et SDS 1%. Mélanger en inversant le tube; ne pas utiliser un Vortex. Laisser à la température de la pièce pendant 10 min.

9. Ajouter 15 mL d'une solution glacée d'acétate de potassium 3 M pH 4.8 et mélanger en inversant brusquement le tube plusieurs fois. Laisser dans la glace pendant 10 min.

10. Centrifuger à 12 000 x *g* pendant 20 min.

11. Récolter le surnageant contenant les plasmides. Ajouter 0.6 volume d'isopropanol, bien mélanger et laisser précipiter pendant 15 min à la température de la pièce (les sels d'acétate de potassium précipitent à 4°C dans l'isopropanol).

12. Centrifuger à 12 000 x *g* pendant 30 min.

13. Jeter le surnageant et laver deux fois le culot avec de l'éthanol 70%. Inverser le tube sur du papier absorbant pour laisser sécher le culot qui deviendra transparent.

14. Pour débarrasser l'ADN plasmidique des protéines ainsi que des ARN de transfert et des ARN ribosomaux, on peut soit procéder à une centrifugation en gradient de CsCl, soit effectuer une purification sur colonne de Sephacryl. Nous recommandons la deuxième technique pour sa simplicité et sa rapidité. Les fractions recueillies peuvent être analysées par électrophorèse en gel d'agarose 0.8%.

2.3.3. Discussion

Cette méthode d'extraction plasmidique convient dans la plupart des cas, cependant elle possède une limite. Si les plasmides présentent une taille supérieure à 25 000 paires de bases, leur ADN se comporte comme l'ADN génomique et ils ne peuvent être séparés en utilisant seulement la technique d'extraction. Cependant, deux possibilités peuvent être envisagées: générer des plasmides plus petits en digérant l'ADN à cloner à l'aide d'endonucléases de restriction ou cloner les ADN de grande taille dans un bactériophage plutôt que dans un plasmide.

3. RÉFÉRENCES

Avi, V. H. et Leder, P. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromotography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69: 1408-1412.

Birnboim, H.C. et Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.

Carter, C., Britton, V.J. et Haff, L. 1983. CsTFA: a centrifugation medium for nucleic acid isolation and purification. Biotechniques 1: 142-147.

Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., Mac Donald, R.J. et Rutter, W.J. 1979. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. Biochemistry 18: 5294-5299.

Glisin, V., Crkvenjakov, R. et Byus, C. 1974. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. Biochemistry 13: 2633-2637.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrock, J. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Mirkes, P.E. 1985. Simultaneous banding of rat embryo DNA, RNA, and protein in cesium trifluoroacetate gradients. Anal. Biochem. 148: 376-383.

Shapiro, D.J. et Schimke, R.T. 1975. Immunochemical isolation and characterization of ovalbumin messenger ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 250: 1759-1764.

25

TRADUCTION *IN VITRO*

Patricia Jouvenne

1. INTRODUCTION

La traduction *in vitro* s'est avérée un excellent moyen de caractériser les ARN messagers (ARNm) et d'étudier les produits qui en résultent, comme par exemple les précurseurs des protéines. Diverses observations sont à l'origine de l'hypothèse du peptide signal expliquant le mécanisme de sécrétion des protéines. Les études réalisées à l'aide des systèmes de traduction *in vitro* ont permis de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la synthèse des protéines et de cerner le rôle des différents éléments impliqués (Revel et Groner 1978). Une application plus récente de ces systèmes est la méthode de "traduction arrêtée par hybridation" permettant d'identifier des ADN complémentaires à des séquences d'ARNm (Paterson *et al.* 1977).

Les systèmes employés le plus couramment dans la traduction *in vitro* sont: le germe de blé, le lysat de réticulocytes et les ovocytes d'amphibien. Nous avons choisi de ne traiter ici que des deux derniers systèmes, compte tenu des avantages qu'ils possèdent. En effet, malgré un emploi aisé et un bruit de fond relativement bas, le germe de blé ne permet pas de traduire efficacement des ARNm codant pour des polypeptides supérieurs à 60 kDa (Clemens 1984). De plus, ce système présente des activités ribonucléasique et protéolytique élevées et produit de nombreux polypeptides incomplets (Pelham et Jackson 1976, Mumford *et al.* 1981).

2. SYSTÈMES DE TRADUCTION *IN VITRO*

2.1. LYSAT DE RÉTICULOCYTES

Ses qualités en font le système de choix pour la traduction des ARNm viraux de petite et grande tailles. Le lysat de réticulocytes est disponible commercialement, mais il peut également être préparé au laboratoire en lysant des érythrocytes immatures prélevés chez des lapins volontairement anémiés (Clemens 1984). Puis, afin de détruire les ARNm endogènes et ainsi d'atténuer le bruit de fond, il est parfois nécessaire de traiter le lysat de réticulocytes à l'aide de la nucléase micrococcale de *Staphylococcus aureus* (Pelham et Jackson 1976). Ce traitement ne diminue ni l'efficacité ni la sensibilité du système. Ce dernier peut

traduire une faible concentration d'ARNm (0.3 µg/ mL) et n'atteindre sa saturation qu'avec une forte concentration (300 µg/mL). Chaque ARNm peut être traduit de 40 à 70 fois au cours d'une incubation de 90 min (Palmiter 1973). Enfin, à partir d'une préparation d'ARN cytoplasmiques totaux, il est fortement recommandé de sélectionner les ARN polyadénylés par chromatographie d'affinité afin d'améliorer la qualité des résultats.

On peut se procurer des lysats de réticulocytes d'origine commerciale déjà traités à l'aide de la nucléase micrococcale. De plus, les fabricants ajoutent les éléments essentiels à l'optimalisation de la traduction, à savoir:

- un système générateur d'énergie (créatine phosphate et créatine phosphokinase)
- un agent qui empêche l'inhibition du facteur d'initiation eIF–2 (cristaux de chlorhydrate d'hème ou hémine)
- des ARN de transfer
- des sels (acétate de potassium et acétate de magnésium). Cependant, pour traduire efficacement certains ARNm, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster les concentrations ioniques

Juste avant la traduction, les ARNm sont dénaturés par la chaleur (100°C pendant 1 min), puis les autres composants de la réaction sont ajoutés (Tableau 1). Le mélange réactionnel est incubé à 30°C pendant 60 min. Néanmoins, la traduction peut se poursuivre au-delà de 2 h de manière à compléter la synthèse des grands polypeptides.

Simultanément à la traduction des ARNm viraux, trois témoins sont indispensables:

1. un témoin négatif: les ARNm extraits des cellules non infectée
2. un deuxième témoin négatif: le lysat de réticulocytes sans ARNm exogène
3. un témoin positif: les ARNm d'un virus connu (fournis avec les lysats de réticulocytes d'origine commerciale)

D'une façon générale, la synthèse des polypeptides à l'aide d'un lysat de réticulocytes s'accomplit essentiellement au cours des 45 premières minutes. Il est aisé de suivre la synthèse protéique en faisant une cinétique d'incorporation de la méthionine [^{35}S] après précipitation à l'aide de l'acide trichloroacétique. Pour terminer, les produits de la traduction sont analysés par immunoprécipitation, séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, puis révélés par fluorographie.

La préparation du lysat de réticulocytes et celle du germe de blé ne permet pas de préserver l'intégrité des membranes et détruit les enzymes impliquées dans les différentes modifications post-traductionnelles des protéines. Dans certains cas, il est nécessaire d'obtenir des polypeptides similaires aux protéines natives: il faut alors choisir les ovocytes d'amphibien.

Méthode

Lysat de réticulocytes .....35 µL

Mélange d'acides aminés
1 mM (sans méthionine) .....1 µL

Méthionine [^{35}S]
(1200 Ci/mmole) .....50 µCi

Inhibiteur de ribonucléases (RNAsin®, Promega Biotec, Madison, Wisconsin) ..... 50 U

ARNm ..... 1 à 5 µg

Volume total ..... 50 µL

Incuber à 30°C pendant 60 min.

2.2. OVOCYTES D'AMPHIBIEN

Les ovocytes de *Xenopus laevis* renferment une impressionnante réserve d'éléments indispensables au développement embryonnaire. Ils contiennent environ 10 000 molécules supplémentaires d'ARN de transfert et 200 000 ribosomes de plus que les cellules somatiques de *Xenopus*.

Les ARNm injectés dans les ovocytes peuvent être traduits jusqu'à 100 000 fois car ils demeurent stables pendant près de deux semaines (Gurdon *et al.* 1973). Contrairement aux systèmes acellulaires, les ovocytes possèdent les enzymes qui modifient correctement les protéines nouvellement synthétisées, incluant le clivage des polypeptides précurseurs, la phosphorylation, la glycosylation, l'hydroxylation et l'acétylation (Colman 1984a). De plus, ce système permet la sécrétion des protéines telles que les interférons, les immunoglobulines, les hormones etc. (Colman 1984a). Cent à mille fois plus efficaces que les lysats de réticulocytes, les ovocytes de grenouille constituent un système complet pour étudier la synthèse et la sécrétion protéiques. Ils sont également utilisés pour la transcription d'ADN exogènes injectés dans le noyau (Colman 1984b). Les transcrits sont alors modifiés en ARNm matures et traduits sans changer de système (Gurdon 1976, De Robertis 1979). De plus, des protéines mutantes peuvent être synthétisées dans les ovocytes après l'injection d'ADN manipulé (McKnight et Gavis 1980).

Cependant, l'utilisation d'ovocytes requiert un équipement très sophistiqué pour la micro-manipulation et la micro-injection, ainsi que la dextérité du manipulateur. Les manipulations et le matériel requis sont détaillés dans Colman (1984a).

Méthode

1. Élever des grenouilles *Xenopus laevis* femelles.

2. Sous anesthésie, prélever une section de l'ovaire.

3. Laver les ovocytes dans une solution saline modifiée de Barth et les séparer par groupes de 5 à 20 (les ovocytes peuvent être gardés plusieurs jours à 19°C).

4. Confectionner et calibrer des micropipettes: cette étape est délicate et vise à obtenir des micropipettes servant à injecter 50 ± 20 nL de solution.

5. Préparer les ARNm: il est recommandé de sélectionner les ARN polyadénylés par chromatographie d'affinité afin d'augmenter leur concentration dans la solution à injecter (voir le Chapitre 24). De 50 à 500 ng d'ARNm peuvent être injectés par ovocyte; mais compte tenu de la sensibilité du système, 10 ng d'ARNm sont parfois suffisants.

6. Après immobilisation des plus gros ovocytes, injecter 50±20 nL d'ARNm dans la partie végétative (jaune). Un manipulateur expérimenté peut injecter de 200 à 300 ovocytes en une heure.

7. Replacer les ovocytes dans la solution saline modifiée de Barth, à 19°C.

8. Marquer les protéines nouvellement synthétisées à l'aide d'acides aminés radioactifs, principalement la méthionine [^{35}S], ou d'autres précurseurs radioactifs comme l'acétate [^{3}H], le phosphate [^{32}P] ou le mannose [^{14}C] selon que l'on veuille démontrer l'acétylation, la phosphorylation ou la glycosylation des polypeptides. Les ovocytes étant perméables aux acides aminés, le matériel radioactif est directement ajouté dans le milieu de culture (0.1 à 5 mCi/mL).

9. Analyser les protéines marquées: après homogénéisation des ovocytes et centrifugation, les protéines marquées se retrouvent dans le surnageant. Elles sont analysées directement, ou après immunoprécipitation, par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

3. CONCLUSION

Les ovocytes de *Xenopus* représentent le système de traduction le plus efficace. Jusqu'à présent, il est le seul système qui permet l'étude des modifications post-traductionnelles et des mécanismes de sécrétion protéique. Cependant, pour l'analyse courante des ARNm, le lysat de réticulocytes demeure le système de choix de la traduction *in vitro*.

4. RÉFÉRENCES

Clemens, M.J. 1980. Translational control of protein synthesis in erythroid cells. Dans *Biochemistry of cellular regulation* Vol. 1. M.J. Clemens (Édit.). CRC Press, Boca Raton, FL, pages 159-191.

Clemens, M.J. 1984. Translation of eukaryotic messenger RNA in cell-free extracts. In *Transcription and translation: a practical approach* B.D. Hames, B.D. et Higgins, S.J. (Édit.). IRL Press, Oxford et Washington, D.C., pages 231-270.

Colman, A. 1984a. Translation of eukaryotic messenger RNA in *Xenopus* Oocytes. Dans *Transcription and translation: a practical approach* B.D. Hames, B.D. et Higgins, S.J. (Édit.). IRL Press, Oxford et Washington, D.C., pages 271-302.

Colman, A. 1984b. Expression of exogenous DNA in *Xenopus* Oocytes. In *Transcription and translation: a practical approach* B.D. Hames, B.D. et Higgins, S.J. (Édit.). IRL Press, Oxford et Washington, D.C., pages 49-69.

De Robertis, E.M. et Olson, M.V. 1979. Transcription and processing of cloned yeast tyrosine tRNA genes micro-injected into frog oocytes. Nature 278: 137-143.

Gurdon, J.B., De Robertis, E.M. et Partington, G. 1976. Injected nuclei in frog oocytes provide a living cell system for the study of transcriptional control. Nature 260: 116-120.

Gurdon, J.B., Lingrel, J.B. et Marbaix, G. 1973. Message stability in injected frog oocytes: long life of mammalian and ß globin messages. J. Mol. Biol. 80: 539-551.

McKnight, S.L. et Gavis, E.R. 1980. Expression of the herpes thymidine kinase gene in *Xenopus laevis* oocytes: an assay for the study of deletion mutants constructed *in vitro*. Nucleic Acids Res. 8: 5931-5948

Mumford, R.A. Pickett,C.B., Zimmerman, M. et Strauss, A.W. 1981. Protease activities present in wheat germ and rabbit reticulocyte lysates. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103: 565-572.

Palmiter, R.D. 1973. Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation. J. Biol. Chem. 248: 2095-2106.

Paterson, B.M., Roberts, B.E. et Kuff, E.L. 1977. Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-arrested cell-free translation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74: 4370-4374.

Pelham, H.R.B. et Jackson, R.J. 1976. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67: 247-256.

Revel, M. et Groner, Y. 1978. Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes. Ann. Rev. Biochem. 47: 1079-1126.

26

CLONAGE DES GÈNES DE VIRUS À ADN

Claire Simard

1. INTRODUCTION

L'analyse de la structure et de la fonction des gènes comprend leur isolement et leur amplification de façon à permettre leur caractérisation physique. Les techniques du génie génétique fournissent le moyen de purifier un gène et ses séquences associées à partir de génomes complexes. L'obtention de quantités importantes d'ADN du gène à étudier se fait via son insertion dans un vecteur de clonage (réplicon). Un vecteur de clonage est une molécule d'ADN (virale ou plasmidique) qui est capable de se répliquer de façon autonome dans un organisme-hôte compatible.

1.1. FRAGMENTATION DE L'ADN À CLONER

Pour pouvoir être inséré et maintenu efficacement dans un vecteur de clonage, l'ADN à cloner doit être fragmenté de façon à générer des molécules de grosseur acceptable pour le vecteur choisi. La digestion par les enzymes de restriction est la façon la plus simple de fragmenter l'ADN; deux types de digestion sont possibles et seront décrits.

1.1.1. Méthode des digestions totales

L'ADN viral à cloner peut être digéré totalement en utilisant une enzyme de restriction qui reconnaît une séquence de six nucléotides (*e.g. Eco*R I, *Hin*d III). Les fragments générés peuvent être insérés dans un vecteur plasmidique linéarisé avec la même enzyme et préalablement déphosphorylé afin d'empêcher la recircularisation du vecteur et ainsi de diminuer le bruit de fond. Cette méthode possède quelques inconvénients:

- Les fragments d'ADN viral produits étant de grosseurs variables, les plus petits seront favorisés au moment de la ligature dans le vecteur.
- Deux fragments ou plus d'ADN viral pourront être insérés dans la même molécule de vecteur.
- Cette méthode ne permettra pas de cloner deux des fragments générés,

dans le cas où le génome viral est constitué d'un ADN linéaire tel que l'adénovirus, le virus herpès et le poxvirus. En effet, il manquera un site cohésif aux deux fragments qui correspondent aux extrémités du génome. Pour pallier à cet inconvénient, l'ADN viral pourrait être traité avec le fragment de Klenow de l'ADN-polymérase I en présence des quatre désoxynucléotides de façon à rendre les extrémités rases; l'ADN serait ensuite digéré avec une enzyme produisant des extrémités rases (*e.g. Sma* I) et les fragments seraient insérés dans un vecteur linéarisé par une enzyme à coupure franche (voir aussi Hammerschmidt *et al.* 1986).

1.1.2. Méthode des digestions partielles

L'ADN génomique purifié est digéré partiellement avec une enzyme de restriction reconnaissant une séquence de 4 nucléotides (habituellement *Sau* 3A ou *Mbo* I) de façon à générer des fragments de grosseur adéquate pour le vecteur choisi, soit d'environ 10 kilo paires de base (kpb) pour un plasmide, 20 kpb pour un vecteur Lambda (Frischauf *et al.* 1983, Maniatis *et al.* 1982) et 35-40 kpb pour un cosmide (Yu-Sun *et al.* 1986). Les fragments sont ensuite insérés dans le site *Bam*H I du vecteur choisi. Cette méthode offre quelques avantages par rapport à la précédente:

- Comme les fragments seront relativement de la même grosseur, la ligature dans le vecteur ne favorisera aucun d'eux.

- Il est fortement recommandé de déphosphoryler les fragments obtenus de l'ADN génomique avant la ligature avec le vecteur pour éviter qu'ils se relient entre eux (et que plus d'un fragment soit inséré dans le même vecteur). Dans ce cas, le vecteur ne doit pas être déphosphorylé, sinon la ligature sera irréalisable.

- Les fragments obtenus seront statistiquement dérivés à partir de toutes les régions du génome et il sera donc possible de faire du "chromosome walking" pour sélectionner les gènes juxtaposés à un recombinant X.

- Cette méthode ne permettra probablement pas non plus de cloner les extrémités d'un génome linéaire; cependant, comme il y est plus probable d'avoir des sites *Sau* 3A que par exemple des sites *Eco* R I près des extrémités, la banque génomique produite sera complète.

1.2. CHOIX DU VECTEUR DE CLONAGE

1.2.1. Les vecteurs lambda et les cosmides

Le bactériophage λ est constitué d'un ADN génomique de 50 kpb. La molécule linéaire double brin possède à ses deux extrémités une séquence d'ADN simple brin de 12 nucléotides complémentaires: cette séquence a été appelée "site *cos*". En modifiant le bactériophage, plusieurs vecteurs lambda ont été construits et le site *cos* du bactériophage a été utilisé pour construire des vecteurs cosmides (Collins 1979)

Ces types de vecteurs offrent deux avantages très importants pour la construction de banques génomiques:

- Des fragments d'ADN jusqu'à environ 20 kpb (ou 35-40 pour les cosmides) peuvent être insérés dans la plupart des vecteurs.

- Le nombre de recombinants obtenus peut être aussi grand que 10^8-10^9/µg

d'ADN initial, grâce aux systèmes d'encapsidation *in vitro* développés pour l'introduction des molécules recombinantes dans *E. coli* (Enquist et Sternberg 1979, Rosenberg *et al.* 1985).

Grâce à cette efficacité de clonage, ces vecteurs seront souvent utilisés au cours de la construction de librairies complètes de très gros génomes, tels que les ADN chromosomiques de cellules eucaryotes ou procaryotes. Cependant, étant donnée que les fragments insérés sont très gros, l'ADN génomique de départ doit être intact.

1.2.2. Les vecteurs plasmidiques

On a construits de nombreux vecteurs vecteurs plasmidiques pour permettre le clonage d'ADN complémentaires ou d'ADN génomiques; le plus populaire est sans contredit le plasmide pBR322 construit par Bolivar *et al.* (1977), puis séquencé par Sutcliffe (1978).

Plusieurs vecteurs ont été dérivés à partir de pBR322 et du bactériophage M13; mentionnons la série des pUC (Vieira et Messing, 1982), les vecteurs pTZ (Pharmacia Fine Chemicals) et Bluescript (Stratagene). Ils offrent l'avantage de pouvoir sélectionner les recombinants directement par leur phénotype négatif d'activité de la β–galactosidase, si un substrat chromogène a été ajouté au milieu de culture pour la croissance des colonies bactériennes (Ruther 1980).

Les familles pTZ, Bluescript et pEMBL (Dente 1983) permettent d'amplifier les gènes clonés sous la forme d'ADN double brin (pour les cartographies physiques et le séquençage chimique) ou d'ADN simple brin (pour les mutagénèses dirigées et le séquençage selon la méthode des didésoxynucléotides).

Tous ces vecteurs devraient offrir la même efficacité d'insertion et de transformation. Le choix du vecteur dépendra du genre d'analyses que l'on veut effectuer avec les recombinants sélectionnés (expression de protéines, séquençage, transcription *in vitro*, mutagénèses dirigées, etc.).

Les techniques du génie génétique permettent donc d'insérer des fragments d'ADN provenant de n'importe quel organisme, dans un réplicon plasmidique ou viral, pour former des molécules chimériques, lesquelles pourront être répliquées dans l'organisme-hôte correspondant au réplicon utilisé. Nous décrivons maintenat un protocole détaillé permettant la construction de banques génomiques de virus à ADN.

2. MÉTHODE

La méthodologie présentée ici illustre le clonage du virus herpès bovin BHV. Le génome linéaire de ce virus est de 140-150 kpb et l'ADN peut être purifié et obtenu en grande quantité avec peu de contamination provenant de l'ADN cellulaire de l'hôte. Dans ces conditions, il est avantageux d'effectuer le clonage dans un vecteur plasmidique (nous choisissons le vecteur Bluescript KS+ de Stratagene parce qu'il est universel, mais un autre vecteur contenant un site unique *Sal* I peut aussi être utilisé). La technique de clonage utilisée a été décrite par Zabarovsky et Allikmets (1986). Le principe de la méthode est le suivant (Figure 1):

1. L'ADN génomique est partiellement digéré avec *Sau* 3A pour générer des fragments d'environ 10 kpb; les bouts cohésifs générés de quatre nucléotides simple brin sont ensuite partiellement remplis avec les nucléotides dATP et dGTP, laissant

seulement 2 nucléotides en simple brin à chaque extrémité.

2. Le vecteur plasmidique Bluescript est linéarisé par digestion totale avec *Sal* I; les bouts cohésifs de quatre nucléotides simple brin sont partiellement remplis avec les nucléotides dTTP et dCTP, laissant 2 nucléotides en simple brin à chaque extrémité.

3. Les fragments d'ADN génomique sont liés avec le vecteur linéarisé dans une réaction de ligature. En conséquence des extrémités libres restantes, il se produira ce qui suit:

   a) les fragments d'ADN génomique ne pourront pas se religaturer les uns aux autres, ni se circulariser (donc tout l'ADN est disponible pour l'insertion dans le vecteur)

   b) une molécule de vecteur ne pourra pas se lier à une autre de même type, ni se circulariser (par conséquent un bas niveau de bruit de fond après transformation)

   c) tous les clones obtenus seront des recombinants (à l'exception de ceux qui auront été obtenus à la suite d'une digestion incomplète du vecteur)

2.1. ISOLEMENT DE L'ADN VIRAL

2.1.1. *Concentration des virions*

1. Déposer le surnageant viral sur un coussin de 5 mL de 40% saccharose dans du tampon TEN (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM) dans un tube pour le rotor SW-28.

2. Compléter le tube avec du TEN et équilibrer.

3. Centrifuger à 25 000 rpm dans le rotor SW 28, à 5°C, durant 2 h.

4. Vider les surnageants par inversion (dans un contenant pour décontamination) et essuyer l'intérieur du tube avec un tissu absorbant.

5. Resuspendre le culot viral dans 400 µL de TEN. Pour aider la suspension, passer quelques secondes aux ultra-sons.

6. Transférer la suspension dans un micro-tube en polypropylène (tube Eppendorf). Rincer le tube initial avec 400 µL de TEN, mélanger au Vortex, et l'ajouter à celle obtenue en 5.

2.1.2. Purification de l'ADN viral

1. Ajouter à la suspension virale les éléments suivants et mélanger par inversion:

   $MgCl_2$ 1 M ..... 8 µL

   ADNase I (10 mg/mL) ..... 4 µL

   RNAsse A (10 mg/mL) ..... 4 µL

2. Incuber à 37°C, durant 1 h.

3. Inactiver l'ADNase par l'addition de 16 µL d'EDTA 0.5 M (10 mM final) et mélanger.

4. Ajouter:

   20% SDS (1% final) ..... 42 µL

   Protéinase K (20 mg/mL) ..... 10 µL

5. La solution virale deviendra claire. Incuber à 37°C durant 1 h.

6. Extraire pendant 2-4 min avec 0.5 volume de phénol équilibré, puis ajouter 0.5 volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1) et extraire encore quelques minutes. Il est conseillé d'inverser le tube et non de mélanger au Vortex durant les extractions afin de ne pas briser mécaniquement l'ADN.

7. Centrifuger, prélever la phase aqueuse et transférer dans un tube propre.

8. Réextraire la phase aqueuse au phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) puis une seconde fois au chloroforme: alcool isoamylique.

9. Ajouter 0.05 volume de 3 M NaOAc pH 5.2 et 2.2 volumes d'éthanol 95% à –20°C.

10. Mélanger (observer la précipitation de l'ADN) et conserver à –20°C durant la nuit.

11. Centrifuger à 4°C durant 10 min, laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70% froid.

12. Sécher à l'air et dissoudre dans 200-600 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM). Doser une aliquote à 260 nm en utilisant la relation:

$$DO_{260\ nm} = 1 = 50\ \mu g/mL$$

2.2. DIGESTION PARTIELLE DE L'ADN GÉNOMIQUE

Solutions

Tampon Sau 3A, 10X

Tris-HCl pH 7.4 ..... 200 mM

$MgCl_2$ ..... 50 mM

KCl ..... 500 mM

Tampon Mbo I, 10X

Tris-HCl pH 8 ..... 500 mM

$MgCl_2$ ..... 100 mM

NaCl ..... 500 mM

Tampon d'arrêt 5X/SDS

Glycérol 25%

EDTA pH 8 ..... 25 mM

SDS 1%

Bromophénol bleu 0.1%

Méthode

1. Dans un microtube sur glace, ajouter:

   ADN génomique purifié ..... 10 µg

   Tampon de digestion 10X ..... 15 µL

   Eau distillée ..... à 150 µL

   Mélanger, centrifuger et replacer à 0°C.

2. Dans un autre tube à 0°C, diluer l'enzyme *Sau* 3A (ou *Mbo* I):

   Sau 3A, 8 U/mL ..... 2 µL

   Tampon de digestion 10X ..... 2 µL

   H_2O ..... 16 µL

   La concentration d'enzyme sera de 0.8 U/µL.

3. Identifier 9 tubes et placer les dans un bain de glace.

4. Distribuer le mélange ADN de la façon suivante:

Tube	*ADN(µL)*	*(unités d'enzyme/µg)*
#1	30	2.0
#2	15	1.0
#3	15	0.5
#4	15	0.25
#5	15	0.125
#6	15	0.0625
#7	15	0.0313
#8	15	0.0156
#9	15	0.0

5. Ajouter 5 µL de l'enzyme diluée au tube #1. Mélanger, centrifuger rapidement et replacer à 0°C.

6. Transférer 15 µL du tube #1 au tube #2 puis mélanger.

7. Transférer 15 µL du tube #2 au tube #3 et mélanger.

8. Continuer ainsi jusqu'au tube #8. *Ne rien ajouter au tube #9* qui sert de témoin non digéré. La concentration finale d'enzyme par µg d'ADN est indiquée dans la colonne de droite.

9. Centrifuger rapidement tous les tubes.

10. Incuber dans un bain à température contrôlée à 37°C durant une heure. La température et le temps d'incubation sont importants puisque cette expérience permettra d'établir les conditions de digestion nécessaires pour obtenir la grosseur de fragments désirée.

11. Placer les tubes à 0°C.

12. Ajouter 4 µL de tampon d'arrêt 5X/SDS aux tubes #1-7 et #9; 8 µL de tampon d'arrêt/SDS au tube #8.

13. Analyser en gel d'agarose 0.6%; chauffer les échantillons à 60-65°C avant de les déposer dans les puits; faire migrer lentement toute la nuit à 15-20 V.

14. Déterminer les meilleures conditions (unités d'enzyme nécessaires par µg d'ADN) pour générer des fragments d'environ 10 kpb.

15. Effectuer une digestion préparative de 20-40 µg d'ADN en conservant les mêmes conditions dans la digestion analytique (mêmes proportions dans les volumes, etc).

16. Prélever une aliquote de 15 µL (donc contenant 1 µg d'ADN) et analyser en gel d'agarose pour vérifier l'état de la digestion.

17. Ajouter au reste de l'échantillon 1 volume de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) et extraire pendant 3-4 min.

18. Centrifuger pendant 5 min à vitesse maximale dans une micro-centrifugeuse.

19. Transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un micro-tube propre; réextraire la phase organique (inférieure) par 0.25 volume de TEN (10 mM Tris-HCl pH 8 1 mM EDTA, 100 mM NaCl), centrifuger 10 min et rassembler les phases aqueuses.

20. Réextraire la phase aqueuse avec 1 volume de chloroforme: alcool isoamylique (24:1).

21. Extraire la phase aqueuse 2 fois avec 2 volumes d'éther diéthylique saturé d'eau. La phase aqueuse se retrouvera *sous* l'éther.

22. Ajouter 0.05 volume de 3 M NaOAc pH 5.2 à la phase aqueuse et 2.2 volumes d'éthanol 95% froid (à –20°C). Bien mélanger.

23. Conserver à –20°C toute la nuit.

24. Centrifuger à 4°C durant 10 min. Enlever le surnageant avec une pipette pasteur étirée au brûleur (attention au culot).

25. Laver le culot avec 500 µL d'éthanol 70% froid (–20°C), centrifuger pendant 1 min et enlever le surnageant.

26. Sécher à l'air, dissoudre dans du TE 1X pour avoir une concentration d'environ 1 µg/ µL. Doser une aliquote à 260 nm en utilisant la relation: $DO_{260\ nm} = 1 = 50\ \mu g/mL$

2.3. LINÉARISATION DU VECTEUR

Solution

Tampon 10X Sal I

Tris-HCl pH 7.5 ..... 1.0 M

NaCl ..... 1.5 M

$MgCl_2$ ..... 0.1 M

Méthode

1. Dans un microtube, ajouter

   Plasmide Bluescript purifié ..... 20 µg

   Tampon 10X *Sal* I ..... 10 µL

   Sal I (environ 50 U) ..... 5 µL

   H_2O ..... 100 µL

2. Mélanger, centrifuger durant 3 sec puis incuber à 37°C durant 2-4 h.

3. Analyser une aliquote (2 µL) sur mini-gel d'agarose 1% en ayant soin d'analyser en parallèle le plasmide non digéré. Si la digestion est incomplète, ajouter 5 µL de *Sal* I et laisser incuber à 37°C toute la nuit. Le lendemain, vérifier si la digestion est complète.

4. Extraire au phénol/chloroforme, puis à l'éther comme ci-haut, et précipiter l'ADN à l'éthanol.

5. Centrifuger 10 min à 4°C, laver le culot à l'éthanol 70% froid et sécher à l'air.

6. Dissoudre dans 20 µL de TE 1X et doser une aliquote.

2.4. REMPLISSAGE PARTIEL DES BOUTS COHÉSIFS

Solution

Tampon Klenow 10X

Tris-HCl pH 7.5 ..... 0.5 M

$MgCl_2$ ..... 0.1 M

Dithiothréitol ..... 1 mM

Méthode

1. Dans un microtube, ajouter:

   ADN viral-*Sau* 3A ..... 10 µg

   Tampon Klenow 10X ..... 5 µL

   dATP 2 mM pH 7 ..... 2.5 µL

   dGTP 2 mM pH 7 ..... 2.5 µL

   H_2O ..... à 48 µL

   Fragment de
   Klenow (6 U/µL) ..... 2.0 µL

2. Dans un autre tube, ajouter:

ADN Bluescript-*Sal* I ..... 10 µg

Tampon Klenow 10X ..... 5 µL

dCTP 2 mM pH 7 ..... 2.5 µL

dTTP 2 mM pH 7 ..... 2.5 µL

H_2O ..... à 48 µL

Klenow (6 U/µL) ..... 2.0 µL

3. Incuber les deux tubes à 30°C, durant 30-45 min.

4. Extraire au phénol/chloroforme et à l'éther comme d'habitude et précipiter l'ADN.

5. Dissoudre dans du TE 1X pour obtenir environ 1 µg/µL.

2.5. LIGATURES

Solution

Tampon ADN ligase 10X

Tris-HCl pH 8 ..... 500 mM

$MgCl_2$ ..... 70 mM

Dithiothréitol ..... 10 mM

2.5.1. Ligatures témoins

1. Dans quatre microtubes sur glace, ajouter:

Tampon ADN ligase 10X ..... 1 µL

ATP pH 7 10 mM ..... 1 µL

H_2O ..... 6 µL

ADN ligase de T4 (10 U) ..... 1 µL

2. Ajouter aux microtubes respectifs:

#1 ADN viral-*Sau* 3A (1 µg/µL) ..... 1 µL

#2 ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP (1 µg/µL) ..... 1 µL

#3 Bluescript-*Sal* I (1 µg/µL) ..... 1 µL

#4 Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP (1 µg/µL) ..... 1 µL

3. Incuber les quatre microtubes à 4°C toute la nuit.

4. Le lendemain, analyser en gel d'agarose 0.6% (analyser en parallèle des standards de masse moléculaire, de l'ADN viral-*Sau* 3A non ligaturé, de l'ADN Bluescript-*Sal* I non ligaturé et de l'ADN Bluescript non digéré).

Par comparaison avec l'ADN-*Sau* 3A ligaturé et non ligaturé, déterminer si les bouts cohésifs de l'ADN viral *Sau* 3A-dAMP-dGMP ont bel et bien été partiellement remplis:

a) si les extrémités sont correctes, les molécules de l'ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP ne se lieront pas les uns les autres et la migration de l'ADN sera équivalente à l'échantillon ADN-*Sau* 3A non ligaturé.

b) l'échantillon ADN viral-*Sau* 3A ligaturé aura une migration moindre (puisque certaines molécules sont liées entres elles par des liens covalents) que l'ADN de départ non ligaturé. Cet essai permet de certifier que la ligase était bien active et ne peut donc être la cause de l'absence de ligature de l'ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP.

De la même façon, déterminer si les bouts cohésifs de l'ADN Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP sont inaptes à la ligature inter ou intramoléculaire.

Si ces analyses sont positives, passer à l'étape suivante, sinon il faudra refaire l'étape avec le fragment de Klenow.

2.5.2. Ligature de l'ADN viral avec le vecteur

La ligature de l'ADN viral dans le vecteur se fait ici en équimolarité. Comme l'ADN viral (fragments de 10 kpb) est environ 3 fois plus gros que le vecteur (environ 3 kpb), il faut 3 fois moins de vecteur que d'ADN viral dans le milieu réactionnel.

1. Dans un microtube sur glace, ajouter:

   Tampon ligase 10X ..... 1 µL

   ATP 10 mM pH 7 ..... 1 µL

   H_2O ..... 5 µL

   ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP (1 µg/µL) ..... 1 µL

   Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP (0.3 µg/µL) ..... 1 µL

   Mélanger puis ajouter:

   ADN ligase de T4 (10 U) ..... 1 µL

2. Dans un deuxième microtube, ajouter:

   Tampon ligase ..... 1 µL

   ATP 10 mM pH 7 ..... 1 µL

   H_2O ..... 6 µL

   Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP (0.3 µg/µL) ..... 1 µL

   ADN ligase T4 (10 U) ..... 1 µL

3. Incuber à 4°C durant toute la nuit. Utiliser ce matériel ligaturé pour transformer des cellules compétentes de *E. coli*.

2.6. TRANSFORMATION DE *E. COLI*

Les techniques les plus courantes pour la transformation de *E. coli*, sont celles décrites par Mandel et Higa (1970) et par Hanahan (1983); le nombre de transformants attendus par ces méthodes est respectivement de 10^6 et de 10^7-10^8/µg de plasmide circulaire. Nous détaillons ici la première méthode.

Solutions

Milieu LB

Extrait de levure Bacto ..... 5 g

Tryptone Bacto ..... 10 g

NaCl ..... 10 g

Eau distillée ..... à 1 L

Pour un agar dur, ajouter 1.5 g de Bacto-Agar/100 mL de milieu LB.

Autoclaver.

$CaCl_2$ 100 mM

$CaCl_2.H_2O$ ..... 7.35 g

Eau distillée ..... 500 mL

Autoclaver.

IPTG (Isopropylthio-ß-galactoside)

100 mM

Isopropyl-thio-β-galactoside 0.119 g

Eau distillée ..... 5 mL

Filtrer stérilement sur une membrane 0.22 µm, répartir en petits volumes et conserver à –20°C.

2% X-Gal

5-bromo-4-chloro-3-indol-β-D-galactoside ..... 0.1 g

N'-N'-diméthylformamide ..... 5 mL

Répartir en petits volumes et conserver à 4°C.

Note: Les manipulations doivent être effectuées stérilement.

2.6.1. Préparation des cellules compétentes

Jour 1

1. À l'aide d'un fil à boucle chauffé au brûleur puis refroidi, étaler des cellules d'*E. coli* XL1-Blue (Tet^r) sur un Petri d'agar dur contenant 10 µg/mL de tétracycline.

2. Incuber le Petri en position inversée jusqu'au lendemain à 37°C, en atmosphère humidifiée.

Jour 2

3. À l'aide d'un fil à boucle stérile, ensemencer 100 mL de milieu LB avec une colonie isolée.

4. Incuber avec agitation forte à 37°C jusqu'à ce que la $DO_{650\ nm} = 0.2$

5. Refroidir les cellules dans un bain d'eau glacée durant 10 min.

6. Centrifuger à 2500 *g* durant 5 min, à 4°C.

7. Suspendre **doucement**, par rotation, le culot cellulaire dans 1 mL de la solution de $CaCl_2$ stérile, à 0°C.

8. Ajouter 40 mL de la solution de $CaCl_2$ et transférer dans un tube de polycarbonate de 50 mL. Incuber sur glace durant 30 min.

9. Centrifuger à 2500 x *g* durant 5 min.

10. Suspendre le culot cellulaire dans 1 mL de $CaCl_2$. Conserver à 0°C.

2.6.2. Transformation proprement dite

11. Distribuer 0.1 mL de cellules compétentes dans des tubes stériles en polypropylène. (Note: On peut conserver le reste des cellules compétentes à 0°C jusqu'au lendemain pour les réutiliser).

12. Ajouter:

Tube		
#1	5 µL	TE 1X (témoin sans ADN)
#2	5 µL	Bluescript intact, 2 ng/µL (témoin d'efficacité)
#3	5 µL	milieu de ligature Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP
#4	5 µL	milieu de ligature ADN viral-*Sau* 3A-dAMP-dGMP avec le Bluescript-*Sal* I-dTMP-dCMP

13. Mélanger doucement et incuber à 0°C durant 30 min.

14. Effectuer un choc thermique à 42°C durant 90 sec, puis placer à 0°C.

15. Ajouter 1 mL de milieu LB et incuber à 37°C durant 1 h afin de permettre l'expression du gène de résistance à l'ampicilline.

Durant le temps d'incubation et afin de permettre une estimation visuelle du nombre de recombinants versus le nombre de transformants, ajouter l'inducteur (IPTG) et un substrat chromogène (X-Gal ou Blue-Gal) du gène de la β–galactosidase à 3 Petris d'agar dur contenant 50 µg/mL d'ampicilline, de la façon suivante :

- Au centre d'un Petri, déposer 10 µL de 100 mM IPTG et 50 µL de X-Gal 2% (ou de Blue-Gal 2%).
- Étendre le mélange sur toute la surface du Petri à l'aide d'un râteau de verre (ou d'une pipette Pasteur stérile recourbée au brûleur).
- Incuber à 37°C durant 30-60 min pour permettre la diffusion des composés.

2.6.3. Étalement des cellules transformées

2.6.3.1. Détermination de la viabilité cellulaire

1. À partir du tube #1, effectuer une dilution de 1:10^6 avec du milieu LB. Étaler 100 µL sur un Petri d'agar dur LB. Cet essai est facultatif mais il permet de vérifier la viabilité des cellules compétentes. En utilisant la relation: $DO_{650\ nm} = 1 = 8 \times 10^8$ cellules de *E. coli*/mL, on peut déterminer le pourcentage de cellules qui ont été sacrifiées durant les manipulations.
2. Étaler 100 µL directement du tube #1 (non dilué) sur un Petri LB contenant 50 µg/mL d'ampicilline (Petri AMP). Aucune croissance ne devra être observée.

2.6.3.2. Détermination de l'efficacité de transformation

On s'attend à une efficacité de 10^6 transformants/µg de plasmide circulaire. Nous avons utilisé 10 ng de Bluescript circulaire donc environ 10 000 transformants sont attendus dans 1.1 mL total.

1. Étaler 50 µL de milieu du tube #2 sur un Petri AMP contenant aussi de l'IPTG et du X-Gal afin de vérifier que les colonies non recombinantes sont bleues.
2. Étaler 50 µL d'une dilution 1:10 sur un Petri AMP.

2.6.3.3. Étalement des transformants et détermination du bruit de fond

1. Étaler:

   50 µL du tube #3 sur un Petri AMP-IPTG-X-Gal

   50 µL du tube 4 sur un Petri AMP-IPTG-X-Gal

2. Une fois que le liquide a été absorbé dans l'agar, incuber tous les Petris en position inversée à 37°C toute la nuit.
3. Ajouter 2.2 µL d'ampicilline 25 mg/mL aux tubes 3 et 4, mélanger et conserver à 4°C pour étalement ultérieur.
4. Le lendemain, dénombrer les colonies.

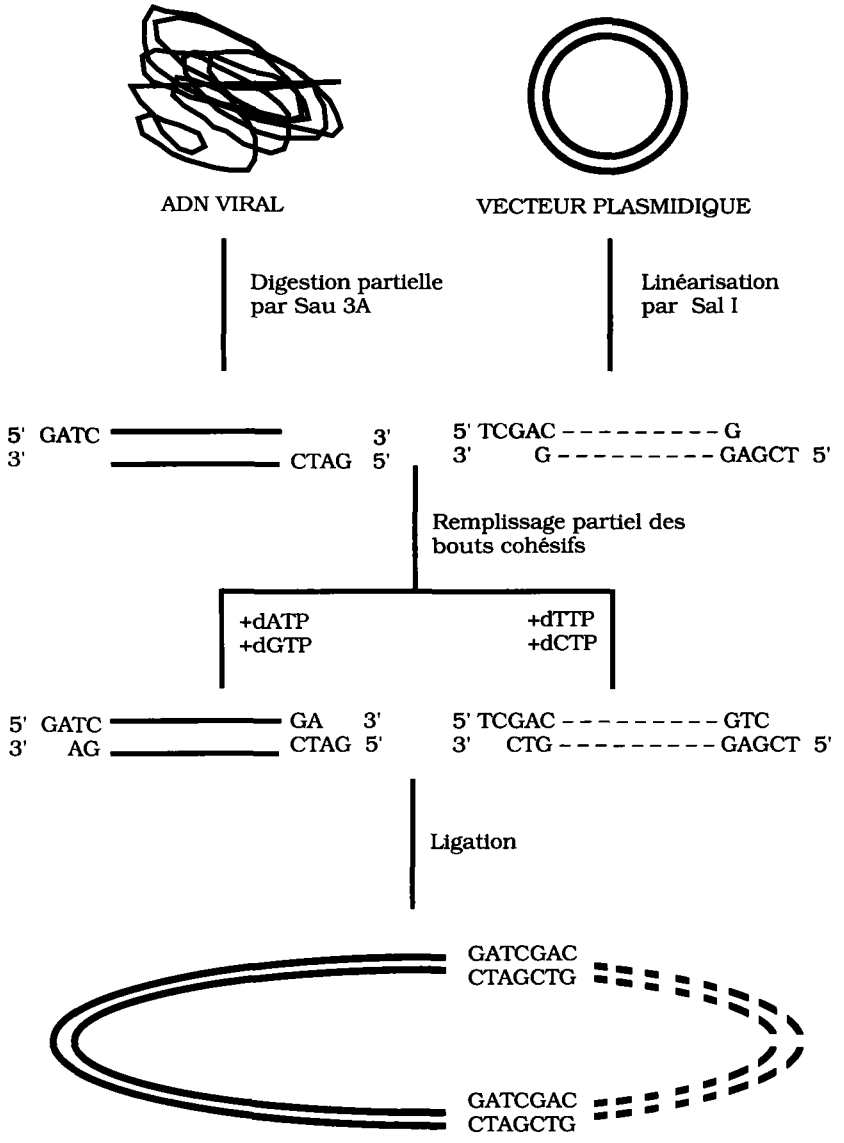
Résultats

Déterminer, quant au nombre de transformants obtenus/µg de vecteur circulaire, le niveau de compétence des cellules à partir du Petri étalé avec le tube #2.

L'étalement effectué avec le tube#3 donnera une indication du niveau de linéarisation du vecteur par *Sal* I: moins il y a de colonies, meilleure a été la digestion.

Le bruit de fond est déterminé en comparant le nombre de colonies bleues et blanches obtenues à partir de l'étalement du tube #4: les colonies bleues correspondent aux cellules transformées avec le vecteur alors que les blanches sont de vrais recombinants (vecteur contenant une insertion).

Selon le nombre de transformants obtenus, étaler le reste des cellules transformées du tube #4 de façon à obtenir des colonies isolées. À ce moment, il n'est pas nécessaire d'utiliser des Petris contenant de l'IPTG et du X-Gal.



3. RÉFÉRENCES

Bolivar, R., Rodriguez, R.L. *et al.* 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2: 95.

Collins, J. 1979. *Escherichia coli* plasmids packageable *in vitro* in Lambda bacteriophage particles. Meth. Enzymol. 68: 309.

Dagert, M. et Ehrlich, S.D. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene 6: 23.

Dente, L., Cesareni, G. and Cortese, R. 1983. pEMBL: a new family of single stranded plasmids. Nucleic Acids Res. 11: 1645.

Enquist, L. et Sternberg, N. 1979. *In vitro* packaging of l Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. Meth. Enzymol. 68: 281.

Frischauf, A.-M., Lehrach, H., Poustka, A. et Murray, N. 1983. Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170: 827.

Hammerschmidt, W., Ludwig, H. et Buhk, H.-J. 1986. Short repeats cause heterogeneity at genomic terminus of bovine herpesvirus I. J. Virol. 58: 43.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557.

Karn, J. Brenner, S., Barnett, L. et Cesareni, G. 1980. Novel bacteriophage Lambda cloning vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5172.

Mandel, M. et Higa, A. 1970. Calcium-dependent Bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 159.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. et Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 545 pages.

Mayfield, J.E., Good, P.J. *et al.* 1983. Cloning and cleavage site mapping of DNA from bovine herpesvirus I Cooper Strain. J. Virol. 47: 259.

McCarron, R.J., Cabrera, C.V., Esteban, M. *et al.* 1978. Structure of vaccinia DNA: analysis of the viral genome by restriction endonucleases. Virology 86: 88.

Natt, E. et Scherer, G. 1986. EMBL 12, a new lambda replacement vector with sites for *Sal* I, *Xba* I, *Bam* HI, *Sst* I and *Eco* RI. Nucleic Acids Res. 14: 7128.

Paez, E. et Esteban, M. 1987. Inhibition of host protein synthesis by DNA viruses: Mechanism of action. In *Mechanisms of viral toxicity in animal cells*, Carrasco, L. ed., CRC Press, Inc.: 59.

Roizman, B. et Batterson, W. 1985. Herpesviruses and their replication, In *Virology*, Fields, B.N., Knipe, D.M. *et al.* eds., Raven Press, New York: 497.

Rosenberg, S.M., Stahl, M.M. *et al.* 1985. Improved in vitro packaging of coliphage lambda DNA: a one-strain system free from endogenous phage. Gene 38:165.

Ruther, U. 1980. Construction and properties of a new cloning vehicle, allowing direct screening for recombinant plasmids. Mol. Gen. Genet. 178: 475.

Sutcliffe, J.G. 1978. pBR322 restriction map marked from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. Nucleic Acids Res. 5: 2721.

Vieira, J. et Messing, J. 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19: 259.

Yu-Sun, K., Liu, C. et Manning, J.S. 1986. Identification of the thymidine kinase gene of infectious bovine rhinotracheitis virus and its function in *Escherichia coli* hosts. Gene 44: 279.

Zabarovsky, E.R. et Allikmets, R.L. 1986. An improved technique for the efficient construction of gene libraries by partial filling–in of cohesive ends. Gene 42: 119.

27

SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE

J. Arnold Verbeek et Max Arella

1. INTRODUCTION

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) comporte l'action de l'enzyme ADN polymérase ARN-dépendante (ou transcriptase inverse) pour synthétiser des molécules d'ADN en utilisant des molécules d'ARN mono ou bicaténaires comme matrices. Depuis la découverte de la transcriptase inverse (Temin et Mizutani 1970, Baltimore 1970) normalement impliquée dans le processus de réplication des rétrovirus, on a largement fait usage des propriétés de cette enzyme pour le clonage de molécules d'ARN messager (ARNm) et le génome de plusieurs virus à ARN. Les conditions d'utilisation de la transcriptase inverse ont été établies pour optimiser l'action de l'enzyme et obtenir la synthèse de transcripts d'ADNc ayant pleine longueur (Maniatis *et al.* 1982, Efstratiadis *et al.* 1976, Buel *et al.* 1978, Retzel *et al.* 1980). Cependant, on ne peut appliquer aucun protocole bien standardisé, puisque différents ARN sont copiés en ADN avec une efficacité variable (Maniatis *et al.* 1982).

Généralement, en présence d'une population hétérogène de molécules d'ARNm, ou de molécules mal caractérisées d'ARN viral génomique polyadénylées, un mélange réactionnel standard de synthèse d'ADNc contient un tampon Tris–HCl 0.1 M à pH 8.3, du potassium (140 à 150 mM), du magnésium (6 à 10 mM) et de 0.1 à 1 mM de chacun des quatre désoxynucléotides triphosphates (Efstratiadis *et al.* 1976, Buel *et al.* 1978, Retzel *et al.* 1980). La température optimale de l'activité de la transcriptase inverse avec le mélange réactionnel ci-dessus est observée à 43°C et, tout comme les "vraies" ADN polymérases, cette enzyme peut synthétiser l'ADN uniquement si elle se trouve en présence d'une amorce pré-existante ayant un groupement hydroxyl libre en 3' apparié à la matrice d'ARN. Puisque la plupart des ARNm d'eucaryotes ont une forme polyadénylée ayant jusqu'à 200 résidus adénylates à leur extrémité 3', ces séquences poly A peuvent être appariées à des molécules d'oligo(dT) (dodécamères ou plus), fournissant ainsi l'amorce nécessaire à la transcriptase inverse pour initier la synthèse de copies d'ADNc. Par la suite, la synthèse du second brin peut être réalisée par l'intermédiaire d'une ADN polymérase (e.g. le fragment de Klenow de l'ADN

polymérase I), ou même par l'utilisation subséquente de la transcriptase inverse, après hydrolyse alcaline ou digestion partielle par l'ARNase H de la matrice d'ARN. Pour pallier à l'absence de séquences poly(A) à l'extrémité 3' de molécules d'ARN bicaténaire tel que le génome segmenté des virus appartenant à la famille des réoviridés), il faut au préalable utiliser l'enzyme poly(A) polymérase d'*Escherichia coli* (Sippel 1973), afin de permettre l'amorçage de la réaction de transcription inverse.

Le produit final des réactions d'ADNc, à partir d'ARNm ou poly(A) ou d'ARN bicaténaire, sera des molécules d'ADN bicaténaire contenant l'information génétique présente originalement sur la matrice d'ARN. L'obtention des molécules pleine longueur d'ADNc dépend principalement de:

- la qualité de l'enzyme transcriptase inverse
- la qualité de la matrice d'ARN (i.e. son niveau de dégradation et/ou de torsion)
- l'absence ou l'efficacité de l'inhibition des ARNases dans les tampons utilisés pour la synthèse du premier brin d'ADNc
- la proportion de transcriptase inverse sur la matrice d'ARNm (Friedman et Robash 1977)

Dans ce chapitre, nous allons traiter de l'obtention d'ADNc à partir de molécules monocaténaires (ARNmc) d'ARN polyadénylé, ainsi qu'à partir de molécules d'ARN bicaténaire (ARNbc).

2. SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE À PARTIR DE MOLÉCULES D'ARN MONOCATÉNAIRE

2.1. SYNTHÈSE DU PREMIER BRIN: UTILISATION D'AMORCES D'OLIGO(dT)

Le mélange réactif contient habituellement 150 à 200 µg/mL d'ARNm ou d'ARN génomiques viral purifiés et/ou sélectionnés sur colonnes d'oligo-dT cellulose. Les molécules d'ARN possèdent fréquemment d'importantes structures secondaires qui peuvent inhiber ou partiellement bloquer la lecture de la matrice par la transcriptase inverse. Ainsi, le DMSO (90%) ou l'hydroxyde de méthyl mercure (en concentration finale de 1 mM), un composé hautement toxique et volatile et qui agit également comme un puissant dénaturant, est ajouté à la solution d'ARN matriciel. Au même moment, des inhibiteurs d'ARNases, tels que les complexess vanadyl-ribonucléosides (concentration finale de 10 mM) ou la RNAasin® (500 unités/mL) sont ajoutés afin de prévenir la dégradation de la matrice. La solution est gardée pendant 15 min à la température ambiante, avant l'addition de β–mercaptoéthanol (β-ME) (concentration finale de 70 mM) afin de stabiliser l'enzyme et de séquestrer les ions mercuriques qui pourraient inhiber la transcription inverse de l'ARN matriciel. Après une incubation à la température ambiante, on procède à la synthèse du premier brin d'ADNc dans un tube de microcentrifugeuse (0.5 ou 1.5 mL) siliconé.

Le mélange réactionnel, dans un volume final de 20 à 40 µL, contient les composantes suivantes:

Tris-HCl pH 8.3 (mesuré à 43°C)	50 mM
$MgCl_2$	10 mM
Dithiothréitol (DTT)	10 mM
Sodium pyrophosphate	4 mM
dGTP	1.25 mM
dATP	1.25 mM
dTTP	1.25 mM
dCTP	0.5 mM
dCTP (α-^{32}P) act. spéc. 3000 Ci/mmol	15 à 20 µCi
Oligo(dT) (12-18 mers)	100 µg/mL
ARN poly(A)+	150 µg/mL
Ajouter en dernier:	
Transcriptase inverse	200 unités

L'incubation s'effectue à 43°C pendant 30 min. Cependant, on peut accroître l'incorporation en faisant une incubation pouvant aller jusqu'à 90 à 120 min et comportant l'addition supplémentaire de transcriptase inverse (1000 unités/ mL) après 60 min d'incubation. Cette incorporation accrue (de 2 à 4 fois) du (α-^{32}P) dCTP, a été observé lors de la synthèse d'ADNc à partir de l'ARN génomique du coronavirus bovin (Figure 1). La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA jusqu'à une concentration finale de 20 mM.

Lorsque l'on désire utiliser la structure en épingle à cheveux se formant en 3' du premier brin de l'ADNc afin de copier le deuxième brin d'ADNc, la matrice d'ARN doit être dégradée par l'addition d'une concentration finale en NaOH de 50 mM et une incubation à 65°C pendant 1 h. Le mélange réactionnel est extrait au phénol/ chloroforme et la phase organique ré-extraite avec un volume égal de 10 mM Tris–HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl et 1 mM EDTA. Les deux phases aqueuses sont combinées et les copies d'ADNc monocaténaires sont séparées des nucléotides non incorporés et des produits résultant de l'hydrolyse alcaline par chromatographie sur colonne-centrifugation (spun-column), par l'utilisation de Sephadex G–50. L'ADNc est ensuite précipité avec 2.5 volumes d'éthanol en présence d'acétate d'ammonium (2 M) à –20°C. Les produits de la réaction sont récoltés par une centrifugation de 15 à 30 min à 4°C dans une centrifugeuse de type Eppendorf.

Lorsqu'une digestion alcaline n'est pas requise, les molécules formant l'hétéroduplex ARN/ADNc sont extraites directement au phénol/ chloroforme et séparées sur colonne-centrifugation de Sephadex G–50.

2.2. SYNTHÈSE DU PREMIER BRIN: AMORCES SYNTHÉTIQUES, D'OLIGO(dT) OU D'ADN DE THYMUS DE VEAU

En présence de molécules d'ARN ayant une taille relativement importante, plusieurs problèmes peuvent survenir surtout à cause de la dégradation de l'ADNc ou de copies incomplètes (terminaisons prématurées) pendant le processus de transcription inverse. La présence de ces arrêts importants de la transcription découle probablement de la formation de structures secondaires sur l'ARN, ce qui provoque une diminution des probabilités de prolonger la formation de l'ADNc à partir de l'extrémité 3' de la matrice. Lorsque l'on connaît déjà des

séquences partielles, des oligonucléotides complémentaires à une région proche de l'extrémité 5' des clones obtenus peuvent être synthétisés et hybridés à la matrice d'ARN. Ainsi, il est possible d'allonger systématiquement, le long de la matrice d'ARN, les fragments d'ADNc clonés. Malgré les succès obtenus avec cette méthode "d'extension d'amorce" pour le clonage et le séquençage du gène codant pour les spicules du coronavirus bovin, ce n'est pas une voie à utiliser de façon prioritaire puisqu'elle requiert la connaissance de séquences terminales en 5' ainsi que la synthèse d'oligonucléotides. De plus, ce procédé s'avère coûteux et laborieux.

Une alternative à l'utilisation d'oligonucléotides synthétiques spécifiques consiste à utiliser des oligonucléotides (6-7 mers) préparés à partir d'ADN de thymus de veau afin d'amorcer au hasard sur la matrice d'ARN une synthèse efficace d'ADNc. Cette approche possède l'avantage de générer des clones représentant la totalité de la matrice d'ARN à l'exception d'une courte séquence de bases à l'extrémité 3'. L'addition simultanée d'amorces d'oligo(dT) et d'amorces aléatoires dans le même mélange réactionnel peut résoudre ce problème. Enfin, parmi les avantages de l'utilisation des amorces aléatoires dans la synthèse d'ADNc, notons qu'elle ne requiert pas la connaissance des séquences de la matrice: elle peut doc être utilisée pour l'obtention de clones provenant de l'intérieur de la matrice et elle est relativement peu dispendieuse.

La synthèse du premier brin d'ADNc, selon la méthode des amorces aléatoires, s'effectue en général dans un volume de 50 µL contenant:

Tris-HCl pH 9.3 (mesuré à 43°C)	50 mM
$MgCl_2$	10 mM
Dithiothréitol	10 mM
Sodium pyrophosphate	4 mM
dATP	125 mM
dGTP	1.25 mM
dTTP	1.25 mM
dCTP	0.50 mM
dCTP (α ^{32}P) (3000 Ci/mmole)	15 à 20 µCi
ARN viral	20 µg
Amorces d'oligonucléotides de thymus de veau	100 µg
Transcriptase inverse	160 unités

Ce mélange réactionnel est incubé à 43°C pendant 30 à 60 min. La synthèse du premier brin d'ADNc peut être détectée en prélevant 1 µL du mélange réactionnel au temps zéro et à différents moments au cours de la réaction afin de suivre l'incorporation de la radioactivité dans les chaînes en formation, par précipitation des macromolécules en présence d'acide trichloroacétique (TCA). Les produits de la synthèse du premier et second brin d'ADNc peuvent être analysés par leur taille après électrophorèse en gel d'agarose et autoradiographie du gel séché (Figure 1).

2.3. SYNTHÈSE DU SECOND BRIN

La synthèse du second brin de l'ADNc peur s'effectuer selon deux méthodes différentes. En effet, pour l'initiation de la synthèse du second brin de l'ADNc, une méthode utilise la formation de structures transitoires d'auto-amorçage en épingle à cheveux, qui sont retrouvées à l'extrémité

3' des molécules formant le premier brin d'ADNc, après l'hydrolyse alcaline de la matrice d'ARN. Le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I d'*E. coli* ainsi que la transcriptase inverse peuvent être utilisés indépendamment ou successivement dans la synthèse du second brin d'ADNc. L'action de la polymérase du fragment de Klenow peut subir une pause ou un arrêt prématuré à des séquences importantes d'arrêt qui peuvent être ignorées par la transcriptase inverse: il est donc conseillé d'utiliser les deux enzymes en succession puisque l'activité de la transcriptase inverse peut être inhibée par des séquences qui ne sont pas inhibitrices pour le fragment de Klenow. Une fois la synthèse du second brin initiée, la synthèse subséquente stabilise la structure en épingle à cheveux. Les produits finaux obtenus de cette réaction sont des molécules d'ADN bicaténaire, reliées à une extrémité par une boucle en épingle à cheveux.

Méthode

1. Les molécules d'ADNc venant d'une synthèse du premier brin sont récupérées par centrifugation à 4°C pendant 15 à 30 min dans une microcentrifugeuse.

2. Les produits sont rincés à l'éthanol 70%, recentrifugés et lyophilisés pendant quelques minutes pour éliminer l'éthanol résiduel.

3. Les culots sont resolubilisés dans le tampon réactionnel du second brin contenant un volume final de 100 µL:

   Tampon HEPES (pH 6.9) ..... 100 mM

   $MgCl_2$ ..... 10 mM

   Dithiothréitol ..... 2.5 mM

   KCl ..... 70 mM

   dCTP ..... 0.5 mM

   dGTP ..... 0.5 mM

   dATP ..... 0.5 mM

   dTTP ..... 0.5 mM

   Fragment de Klenow
   20 à 50 unités

4. L'incubation est réalisée à 15°C pendant 20 h afin de permettre à l'enzyme de rechercher en 3' les structures transitoires et instables en épingle à cheveux et de synthétiser le second brin. D'autres protocoles ont également été publiés avec des différences mineures dans la concentration des composés mentionnés et des temps d'incubation pouvant être aussi courts que 30 min à 15°C.

5. La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA en concentration finale de 20 mM, suivie d'une extraction au phénol/chloroforme, d'une chromatographie/centrifugation sur Sephadex G–50 et d'une précipitation à l'éthanol.

6. Après centrifugation et lyophilisation, les produits de la réaction précédente sont resolubilisés dans 50 µL du tampon de transcriptase inverse contenant:

   Tris-HCl (pH 8.3)

   (mesuré à 43°C) ..... 50 mM

   $MgCl_2$ ..... 10 mM

   Dithiothréitol ..... 10 mM

   Sodium pyrophosphate ..... 4 mM

   dNTP (dGTP, dCTP,
   dATP, dTT) chacun ..... 1.25 mM

β-mercaptoéthanol ..... 20 mM

Transcriptase inverse ..... 150 unités

7. L'incubation se fait à 43°C pendant 60 min.

8. La réaction est arrêtée par l'addition d'EDTA et toutes les étapes subséquentes sont identiques à celles déjà décrites pour les produits de la réaction avec l'enzyme de Klenow. Enlever la structure en épingle à cheveux en 3' et toute partie monocaténaire de l'ADN à l'autre extrémité des molécules d'ADNc par un traitement avec la nucléase S1, spécifique des régions monocaténaires et qui donne ainsi des molécules bicaténaires entières.

2.4. DIGESTION AVEC LA NUCLÉASE S1

Il est suggéré d'effectuer une expérience pilote avec la nucléase S 1 afin d'établir les conditions expérimentales donnant des molécules avec une distribution modale similaire à celle obtenue après la synthèse du premier brin de l'ADNc. Si la nucléase est trop active, les molécules générées seront plus petites que le premier brin (ADNc). Par contre si la nucléase n'est pas assez active, les molécules analysées seront deux fois plus grandes que le premier brin de synthèse, indiquant que les deux brins sont reliées par un lien covalent.

1. Après centrifugation de l'échantillon précipité à l'éthanol, les molécules d'ADNc bicaténaires sont resuspendues dans 20 à 30 µL d'eau bidistillée. Cinq aliquotes contenant chacune approximativement 2000 dpm de radioactivité incorporée (^{32}P) sont resuspendus dans un volume total de 20 µL dans du tampon S1 composé de:

NaCl ..... 200 mM

Acétate ..... 50 mM

$ZnSO_4$ ..... 1 mM

Glycérol 5%

2. Additionner respectivement chaque aliquote de 0, 1, 2, 3 et 6 unités de nucléase S1 et incuber pendant 30 min à 37°C.

3. Les réactions sont arrêtées par l'addition de EDTA (concentration finale de 5 mM), et les échantillons sont analysés en gel d'agarose en conditions alcalines, en même temps qu'un aliquote de la réaction de synthèse du premier brin d'ADNc et de marqueurs de masses moléculaires radiomarqués (fragments de restriction de pBR–322, ADN lambda coupé par *Eco*R 1/ *Hin*d III).

4. Le gel est fixé dans l'acide trichloroacétique 7% pendant 30 min, lavé brièvement à l'eau, et séché avant d'être exposé pour la nuit en autoradiographie à –70°C, en présence d'écrans intensifiants.

Cette expérience préliminaire permet de sélectionner les conditions optimales permettant d'obtenir le même patron de migration que celui observé avec les molécules monocaténaires d'ADNc. Ces conditions peuvent être utilisées avec la préparation d'ADNc bicaténaire.

Une solution de rechange est de transférer l'ADN, séparé par électrophorèse en gel, à des feuilles de nitrocellulose par transfert de type Southern, après avoir submergé le gel dans une solution contenant 0.5 mM Tris-HCl pH 7.5 et 1 M NaCl. Les feuilles de nitrocellulose peuvent ensuite être exposées de la même manière que les gels séchés.

Après réalisation de la digestion de l'ADNc bicaténaire à l'aide de la nucléase S1, les oligonucléotides relâchés sont éliminés par chromatographie sur colonne; plusieurs matrices sont utilisées à cette fin (Sephadex G–50, G–75, Sepharose CL–4B etc.). Étant donné que le traitement à la nucléase S1 ne laisse pas toujours les bouts terminaux avec des extrémités franches, il est suggéré d'utiliser une incubation subséquente avec le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I afin d'obtenir une efficacité de clonage accrue des duplex d'ADNc.

2.5. SYNTHÈSE DU SECOND BRIN: UTILISATION DE L'ARN-ASE H

Cette méthode concerne la synthèse du second brin d'ADNc par l'utilisation de l'ARNase H dégradant partiellement l'ARN dans l'hétéroduplex ARN/ ADN. On obtient un premier brin d'ADNc auquel des amorces d'ARN sont attachées. L'incubation de ce produit avec l'ADN polymérase I et l'ADN ligase donne naissance à des molécules bicaténaires d'ADN. Cette méthode évite l'utilisation de la nucléase S1 pour couper l'épingle à cheveux et est généralement plus rapide puisque la réaction peut être réalisée en une seule étape.

1. Cette réaction s'effectue dans 100 µL du milieu réactionnel suivant et peut accommoder jusqu'à 1 µg d'hybride (500 ng d'ADNc):

   Tris-HCl (pH 7.5) ..... 20 mM

   $MgCl_2$ ..... 5 mM

   $(NH_4)_2SO_4$ ..... 10 mM

   KCl ..... 100 mM

   ß-NAD ..... 0.15 mM

   Albumine sérique bovine (qualité biologie moléculaire) ..... 5 µg

   dNTP ..... 40 mM

   ARNase H ..... 1 unité

   ADN polymérase I ..... 23 unités

   ADN ligase (*E. coli*). ..... 1 unité

2. Les incubations ont lieu de façon séquentielle pendant 60 min à 12°C, puis 60 min à 22°C.

3. Les produits de la réaction sont extraits au phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol en présence d'acétate d'ammonium (2 M) et lyophylisés. L'ADNc bicaténaire ainsi préparé est maintenant prêt pour l'addition de séquences homopolymériques à l'aide de l'enzyme transférase terminale ou pour l'addition de polylinkers à l'aide de l'ADN ligase.

3. DISCUSSION

La synthèse d'ADNc ne cause plus de nos jours de difficultés majeures puisque l'on peut obtenir des préparations de transcriptases inverses très actives et dépourvues d'activité ARNase. La difficulté principale pour l'obtention de molécules pleine longueur pour le premier brin de l'ADNc est reliée aux cassures et/ou dégradations que l'on peut provoquer sur les molécules d'ARN. Cependant, même s'il est parfois impossible d'isoler des molécules intactes d'ARN (surtout dans le cas où le génome est très long), il est toujours possible, par extension de l'amorce et/ou amorçage aléatoire de la réaction de transcription inverse par des oligonucléotides synthétiques, d'obtenir une population hétérogène d'ADNc représentant la totalité de la matrice d'ARN. La méthodologie d'amorces aléatoires pour la synthèse du premier brin de l'ADNc est très efficace; cependant, il faut prendre beaucoup de

précautions avec des préparations brutes d'ARN. En effet, des molécules contaminantes d'ARN ou d'ADN seront copiées, ce qui résultera en l'obtention de fragments clonés qui ne sont pas reliés aux matrices d'ARN que l'on désire cloner. Lorsqu'on se trouve en présence d'ARN obtenus de virions purifiés à partir de cellules cultivées, une sélection négative peut être réalisée par hybridation différentielle des clones obtenus en utilisant de l'ARN/ADN isolé de cultures cellulaires ou de fragments de tissus non infectés. La synthèse du second brin par l'utilisation de l'amorce en 3' (épingle à cheveux) est moins efficace que celle comportant un traitement à l'ARNase H, puisque les boucles de l'épingle sont transitoires; ceci résulte souvent en la perte de l'amorce pour la synthèse du second brin. Le procédé à l'ARNase H élimine le clivage par la nucléase S 1 de la boucle. Il est préférable d'utiliser cette méthode, puisque son application est à la fois simple et efficace. La synthèse de molécules bicaténaires d'ADNc doit être réalisée rapidement surtout lorsqu'on utilise le (^{32}P) dCTP pour vérifier l'incorporation dans les chaînes naissantes. En effet, l'atome ^{32}P subit une décroissance par émission d'une particule-bêta, tout en transmutant à un atome ^{32}S, qui conservera l'énergie d'excitation. Le soufre n'est pas aussi stable que le phosphore pour la formation de la liaison ester, ce qui permet à l'énergie d'excitation de causer la scission du brin contenant la formation du nouvel atome de soufre. Ce phénomène peut conduire à la dégradation de l'amorce après synthèse du premier brin d'ADNc. Cependant, le radiomarquage d'une aliquote du mélange réactionnel et l'utilisation d'un mélange non radio-marqué d'ADNc bicaténaire pour le clonage permettent d'éviter ce problème.

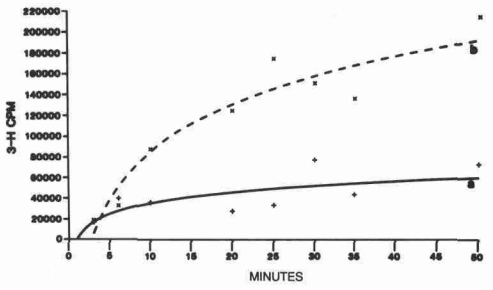


Figure 1

Synthèse du premier brin d'ADNc par la trancsriptase inverse agissant sur l'arn génomique du coronavirus bovin.

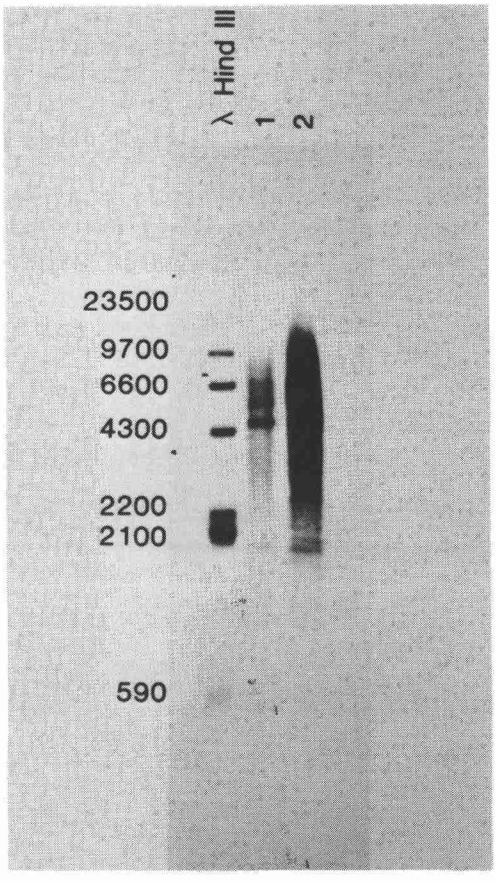


Figure 2

Synthèse du premier et du deuxième brin d'ADNc obtenu à partir de l'ARN génomique du coronavirus bovin. Analyse de la taille de cet ADNc par électrophorèse en gel d'agarose et autoradiographie. L'Adn du bactériophage λ coupé par *Hind* III est utilisé comme marqueur de la taille des nucléotides synthétisés.

4. RÉFÉRENCES

Baltimore, D. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase. Nature 226: 1209-1211.

Binns, M. M., Boursnell, M.E.G., Cavanagh,D., Pappin, D.J.C. and Brown, T.D.K. 1985. Cloning and sequencing of the gene encoding the spike protein of the Coronavirus IBV. J. Gen. Virol. 66: 719-726.

Binns, M.M., Boursnell, M.E.G., Foulds, I.J. and Brown, T.D.K. 1985. The use of a randon priming procedure to generate cDNA libraries of infectious bronchitis virus, a large RNA virus. J. Virol. Meth. 11: 265-269.

Buel, G.N., Wickens, M.P., Payvar, F., and Schminke, R.T. 1978. Synthesis of full-lenght cDNA's from four partially purified oviduct mRNA's. J. Biol. Chem. 253: 2471.

Efstratiadis, A., Kafatoc, F.C., Maxam, A.M. and Maniatis, T. 1976. Enzymatic *in vitro* synthesis of globin genes. Cell, 7: 279.

Friedman, E.Y. and Rosbash, M. 1977. The synthesis of high yields of full-lenght reverse transcripts of globin mRNA. Nucleic Acid Research 4: 3455

Gubler, U. and Hoffman, B.J.. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25: 263-269.

Higuchi R., Paddock, G.V., Wall, R. and Salser, W. 1976. A general method for cloning eukaryotic structural gene sequences. P.N.A.S.-USA 73: 3146-3156.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J.J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, NY.

McDonnell, M.W., Simon, M.N. and Studier, F.W. 1977. Analysis of restriction fragments of T-7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol. 110: 119.

Okayama, H. and Berg, P. 1982. High efficiency cloning of full lenght cDNA. Mol. Cell. Biol. 2: 161-170.

Perbal, B. 1984. *A practical guide to molecular cloning.* A Wiley-Interscience Publication, pages 422-425.

Retzel, E.F., Collet. M.S. and Faras. A.J. 1980. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid by the avian retrovirus reverse transcriptase in vitro: Optimum conditions required for transcription of large ribonucleic acid templates. Biochemistry 19: 513.

Seeburg, P.H., Shine, J., Marshall, J.A., Baxter, J.D. and Goodman, H.M. 1977. Nucleotide sequence and amplification in bacteria of a structural gene for rat growth hormone. Nature 220: 486.

Sippel, A.E. 1973. Purification and characterization of adenosine triphosphate: Ribonucleic acid adenyltransferase from *Escherichia coli.* Eur. J. Biochem. 37: 31-39.

Temin, H.M. and Mizutani, S. 1970. Viral RNA-dependent DNA polymerase. Nature 226: 1211-1213.

28

SÉQUENÇAGE D'ADN

François Fossiez

1. SÉQUENÇAGE PLASMIDIQUE

Le séquençage de l'ADN est l'une des techniques les plus importantes pour l'analyse des gènes. Il existe deux méthodes efficaces permettant de déterminer la séquence nucléotidique d'un ADN. Celle de Maxam et Gilbert (1977) est basée sur une dégradation chimique de l'ADN, alors que la technique développée par Sanger *et al.* (1977) consiste à bloquer la synthèse enzymatique d'un ADN à l'aide de didésoxyribonucléosides triphosphates (ddNTP). La rapidité et la simplicité de cette dernière méthode ont rendu son emploi plus fréquent.

Dans cette méthode, l'ADN le plus souvent utilisé comme brin gabarit est le génome monocaténaire et circulaire du bactériophage M13 recombinant. On a cependant observé que les insertions d'ADN de grande taille avaient tendance à s'exciser du bactériophage M13.

Une variante de la technique de Sanger s'applique directement aux ADN plasmidiques après dénaturation et présente les avantages suivants (Chen et Seeburg 1985, Deininger 1983, Guo *et al.* 1983, Haltiner *et al.* 1985, Hattori et Sakaki 1986, Hong 1982, Koneluk *et al.* 1985, Vieira et Messing 1982, Zagursky *et al.* 1985):

(1) L'insertion d'ADN est généralement plus stable dans un plasmide que dans le bactériophage M13.

(2) Les ADN n'ont plus besoin d'être sous-clonés dans M13, ce qui représente une économie de temps appréciable.

(3) L'ADN plasmidique devant servir au séquençage peut être purifié par la technique de lyse alcaline (Birnboim et Doly 1979), à partir de 1.5 mL de culture.

(4) De nombreux plasmides permettent de séquencer chacun des deux brins de l'insertion en utilisant des amorces qui s'hybrident respectivement de chaque côté du site de clonage (voir Figure 1).

Cependant, la lecture de la longueur de la séquence après séquençage plasmidique est en général inférieure à celle que donnera la lecture faite après sous-clonage dans le bactériophage M13.

De nombreuses compagnies vendent des appareils d'électrophorèse pour gel de séquence: BRL, Bio-Rad, Pharmacia, IBI, etc.

Le protocole expérimental suivant s'applique à des culots d'ADN plasmidiques secs obtenus par la technique précédemment décrite dans ce volume (Chapitre 24, section 2.3.1.).

2. MÉTHODE

Solutions

Tampon de séquençage

Tris-HCl (pH 8.9) ..... 0.60 M

NaCl ..... 0.75 M

$MgCl_2$ ..... 75 mM

DTT ..... 5 mM

Mélange nucléotidique A,T,G et C, selon le tableau ci-contre.

Tampon d'électrophorèse 10X (pH 8.3)

Tris-base ..... 1 M

Acide borique ..... 1 M

EDTA ..... 20 mM

Gel de polyacrylamide 8%
(rapport bis:acrylamide de 1:19)

Acrylamide ..... 7.6 g

Bis-acrylamide ..... 0.4 g

Urée ..... 50 g

Tampon 10X ..... 10 mL

H_2O ..... 60 mL

Persulfate d'ammonium
10% ..... 1 mL

TEMED ..... 10 µL

Volume final de 100 mL

Solution d'arrêt

Formamide déionisée ..... 980 µL

EDTA 1M pH 8 ..... 20 µL

Bleu de bromophénol ..... 1 mg

Xylène cyanol ..... 1 mg

Conserver à –20°C.

Méthode

Précipitation au polyéthylène glycol (PEG)

1. Afin d'éliminer les contaminants qui interfèrent lors de la réaction de séquençage, resuspendre l'ADN plasmidique dans 50 µL de Tris-HCl 10 mM pH 8 et 1 mM EDTA.

2. Ajouter 30 µL de PEG 6000 20% NaCl 2.5 M (autoclavé). Laisser précipiter sur glace pendant 1 h, puis centrifuger à 12 800 x g pendant 5 min dans une centrifugeuse Eppendorf.

3. Jeter le surnageant et laver deux fois le culot avec de l'éthanol 70%.

4. Sécher le culot d'ADN plasmidique dans une centrifugeuse sous vide.

Dénaturation des plasmides

1. L'ADN plasmidique est resuspendu dans 18 µl de NaOH 0.2N, EDTA 0.2 mM et dénaturé à la température de la pièce pendant 5 min. Puis l'ADN est précipité par l'addition de 2 µl d'acétate d'ammonium 2M (pH

4.5) et 100 µl d'éthanol absolu. Après 20 min à –70°C, les tubes sont centrifugés à 12 000 x *g* et les culots d'ADN sont lavés à l'éthanol 70%. Les culots sont séchés sous vide et peuvent être ainsi conservés à –20°C.

Hybridation des amorces aux plasmides dénaturés

2. Solubiliser les culots d'ADN plasmidiques dénaturés dans:

   Amorce (10 µg/µL) .....7.0 µL

   Tampon de séquençage .....1.5 µL

   H_2O .....1.5 µL

3. Chauffer le mélange plasmide-amorce à 50°C pendant 20 min.

4. Pendant ce temps, préparer quatre tubes marqués A, T, G et C pour chaque plasmide à séquencer en y déposant 2 µL du mélange nucléotidique approprié (selon le tableau suivant). Conserver ces tubes sur glace.

Tableau de préparation des mélanges nucléotidiques

	A		T		G		C	
Solutions mères	µL	µM*	µL	µM*	µL	µM*	µL	µM*
2 mM dGTP	6.25	250	6.25	250	2.13	85	6.25	250
100 µM dATP	3.4	6.8	2.50	5	2.50	5	2.50	5
2 mM dTTP	6.25	250	1.28	51	6.25	250	6.25	250
2 mM dCTP	6.25	250	6.25	250	6.25	250	1.28	51
250 µM ddGTP	–	–	–	–	2.52	12.6	–	–
50 µM ddATP	1.26	1.26	–	–	–	–	–	–
250 µM ddTTP	–	–	2.52	12.6	–	–	–	–
250 µM ddCTP	–	–	–	–	–	–	2.52	12.6
H_2O	26.6		31.2		30.4		31.2	
Volume final	50.0		50.0		50.0		50.0	

* Concentration finale dans le mélange

La proportion de dNTP:ddNTP peut-être augmentée si l'on désire obtenir la séquence d'une région située près de l'amorce, ou diminuée si l'on désire au contraire lire les séquences éloignées de l'amorce.

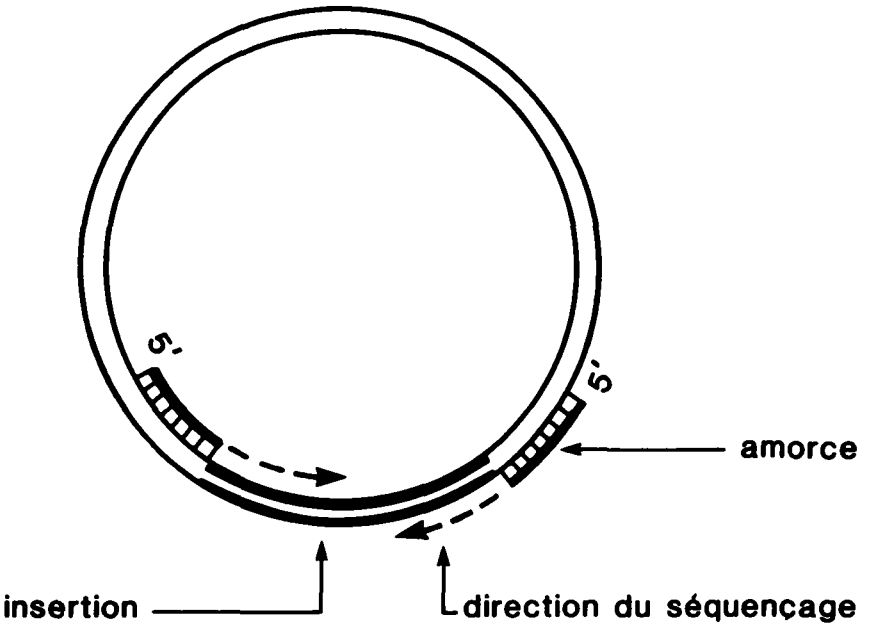


Figure 1

Schéma classique d'un plasmide recombinant contenant une insertion

Les amorces de séquençage, hybridées en 5' de l'insertion sur les plasmides dénaturés, permettent à la transcriptase inverse d'initier la synthèse d'un brin complémentaire. Cette réaction effectuée en présence de dATP[^{35}S], de dNTP et de ddNTP produit des brins d'ADN marqués de longueurs variables, qui, une fois séparés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-urée, révèlent la séquence d'une des extrémités de l'insertion.

Réaction de séquençage

5. Dans chaque tube de mélange plasmide-amorce ajouter:

   Transcriptase inverse du virus de la myéloblastose aviaire (AMV) ..... 20 µL

   dATP[^{35}S] (> 600 Ci/mmole, 10 mCi/mL) ..... 5 µL

   Important: maintenir les tubes à 42°C afin de réduire le taux de renaturation des plasmides.

6. Distribuer 3.6 µL de ce mélange dans chacun des tubes marqués A, T, G et C.

7. Incuber à 42°C pendant 20 à 30 min.

8. Préparer un gel de polyacrylamide de 6 ou 8% contenant de l'urée (7M) et démarrer la pré-électrophorèse du gel. Ajuster le courant (environ 60 W) afin d'obtenir une température de 50°C à la surface du gel après 30 min de pré-électrophorèse.

9. Ajouter 2 µL d'une solution 0.25 mM de chaque désoxyribonucléoside triphosphate.

10. Continuer l'incubation à 42°C pendant 15 min.

11. Vérifier la température du gel.

12. Ajouter 7 µL de solution d'arrêt dans chaque tube. Chauffer à 100°C pendant 3 min, puis refroidir brusquement dans un bain de glace avant

de charger le gel de polyacrylamide-urée. Les échantillons peuvent éventuellement être conservés à –20°C pendant un maximum de 7 jours avant l'électrophorèse.

Électrophorèse

13. Nettoyer les puits avant de charger les échantillons afin d'éliminer l'urée, les débris de polyacrylamide et les bulles d'air. **RAPPEL: couper le courant avant de nettoyer ou de charger le gel.**

14. Déposer environ 3 µL de chaque mélange réactionnel dans les puits et remettre le courant.

15. Laisser migrer le bleu de bromophénol jusque dans le bas du gel.

16. Couper le courant, vider le réservoir supérieur de son tampon et retirer le gel.

17. Séparer les plaques de verre à l'aide d'une spatule flexible.

18. Il est conseillé de fixer le gel pendant 20 min dans 2 L d'un mélange d'acide acétique 5% et de méthanol 5% (cette étape arrête la diffusion des ADN, élimine l'urée qui atténue le signal radioactif émis par le ^{35}S et rend le gel plus solide).

19. Récupérer le gel sur une feuille de papier Whatman 3MM. Recouvrir d'une pellicule plastique et sécher à 80°C pendant environ 30 min.

20. Mettre le gel sec en contact avec un film à autoradiographie pendant 16 à 36 h.

21. La lecture du gel s'effectue tel que décrit dans la Figure 2.

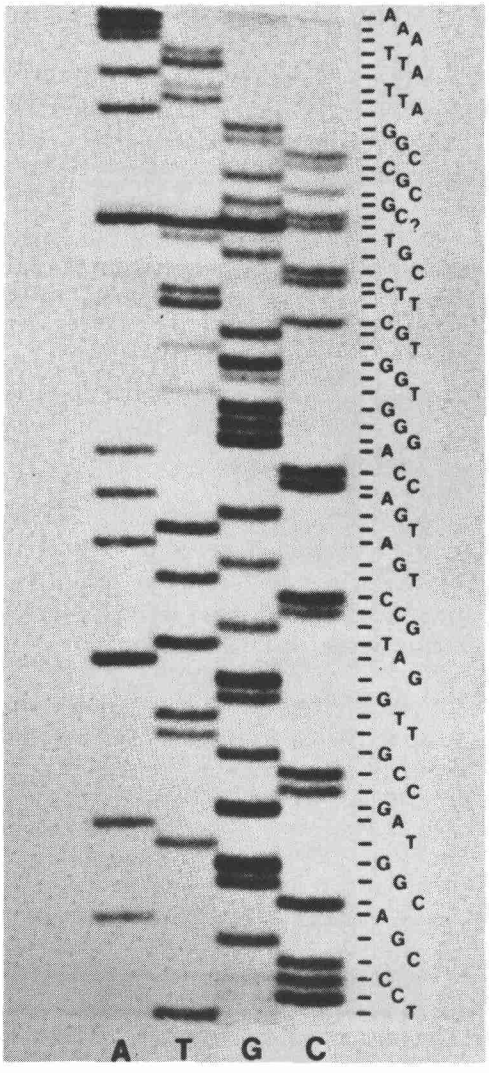


Figure 2

Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 8% contenant de l'urée 7M et soumis à un courant de 60 W pendant 3 h. A, T, G et C désignent les produits des réactions qui ont été déposés dans les puits. Une bande radioactive dans le puits A indique que la synthèse de l'ADN a été inhibée par l'incorporation d'un ddATP, démontrant la présence d'un A dans la séquence. Cette dernière est donc révélée par la succession des bandes radioactives et se lit du bas vers le haut (5'---> 3'). Certaines ambiguïtés peuvent éventuellement se produire lorsqu'une bande apparaît simultanément dans les 4 puits. La séquence exacte est alors déterminée par le séquençage du brin complémentaire.

3. RÉFÉRENCES

Birnboim, H.C. et Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513-1523.

Chen, E.Y. et Seeburg, P.H. 1985. Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. DNA 4: 165-170.

Deininger, P. 1983. Approaches to rapid DNA sequence analysis. Anal. Biochem. 135: 247-263.

Gino, L., Yang, R.C.A. et Wu, R. 1983. An improved strategy for rapid direct sequencing of both strands of long DNA molecules cloned in a plasmid. Nucleic Acids Research 11: 5521-5540.

Haltiner, M., Kempe, T. et Tijian, R. 1985. A novel strategy for constructing clustered point mutations. Nucleic Acids Res. 13: 1015-1025.

Hattori, M. et Sakaki, Y. 1986. Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem. 152: 232-238.

Hong, G.F. 1982. Sequencing of large double-stranded DNA using the dideoxy sequencing technique. Bioscience Rept 2: 907-912.

Korneluk, R.G., Qnan, F. et Gravel R.A. 1985. Rapid and reliable dideoxy sequencing of double stranded DNA. Gene 40: 317--323.

Vieira, J. et Messing, J. 1982. The pUC plasmids, and M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene 19: 259-268.

Zagursky, R.J., Baunmeister, K., Lerman, N. et Berman, M. 1985. Rapid and easy sequencing of large linear double stranded DNA and supercoiled plasmid DNA. Gene Anal. Tech. 2 : 89-94.

29

ÉTALEMENT DES ACIDES NUCLÉIQUES ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Robert Alain

1. INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, de nombreuses techniques ont été développées pour l'examen des acides nucléiques ou des complexes acide nucléique-protéine. La première méthode a été décrite par Kleinschmidt et Zahn en 1959. Cette technique dite de Kleinschmidt a été modifiée en méthodes fiables et routinières pour la caractérisation et la cartographie génétique. Avec les enzymes de restriction et les techniques de séquençage, on a utiliser ces méthodes lors des études en microscopie électronique de la réplication, de la recombinaison, de la transcription et de la traduction (Fisher 1981).

La technique de Kleinschmidt consiste essentiellement à mélanger une solution d'acide nucléique à une protéine globulaire, tel que le cytochrome c. On observe alors la formation d'un complexe acide nucléique-protéine qui constitue l'hyperphase. Après étalement de ce mélange sur une surface liquide (hypophase), la protéine se dénature à l'interface air–solution pour constituer un film insoluble qui emprisonne l'acide nucléique et provoque son extension. On effectue ensuite le transfert du complexe sur une grille-support, puis on augmente le contraste par évaporation de métaux (platine, carbone-platine, platine-palladium, etc.) et, finalement à l'examen au microscope électronique.

Cette technique semble simple, mais plusieurs détails nécessitent une attention particulière si l'on veut en assurer le succès. De plus, la méthode varie selon le type d'acide nucléique étudié (ADN ou ARN) et les interactions avec les protéines.

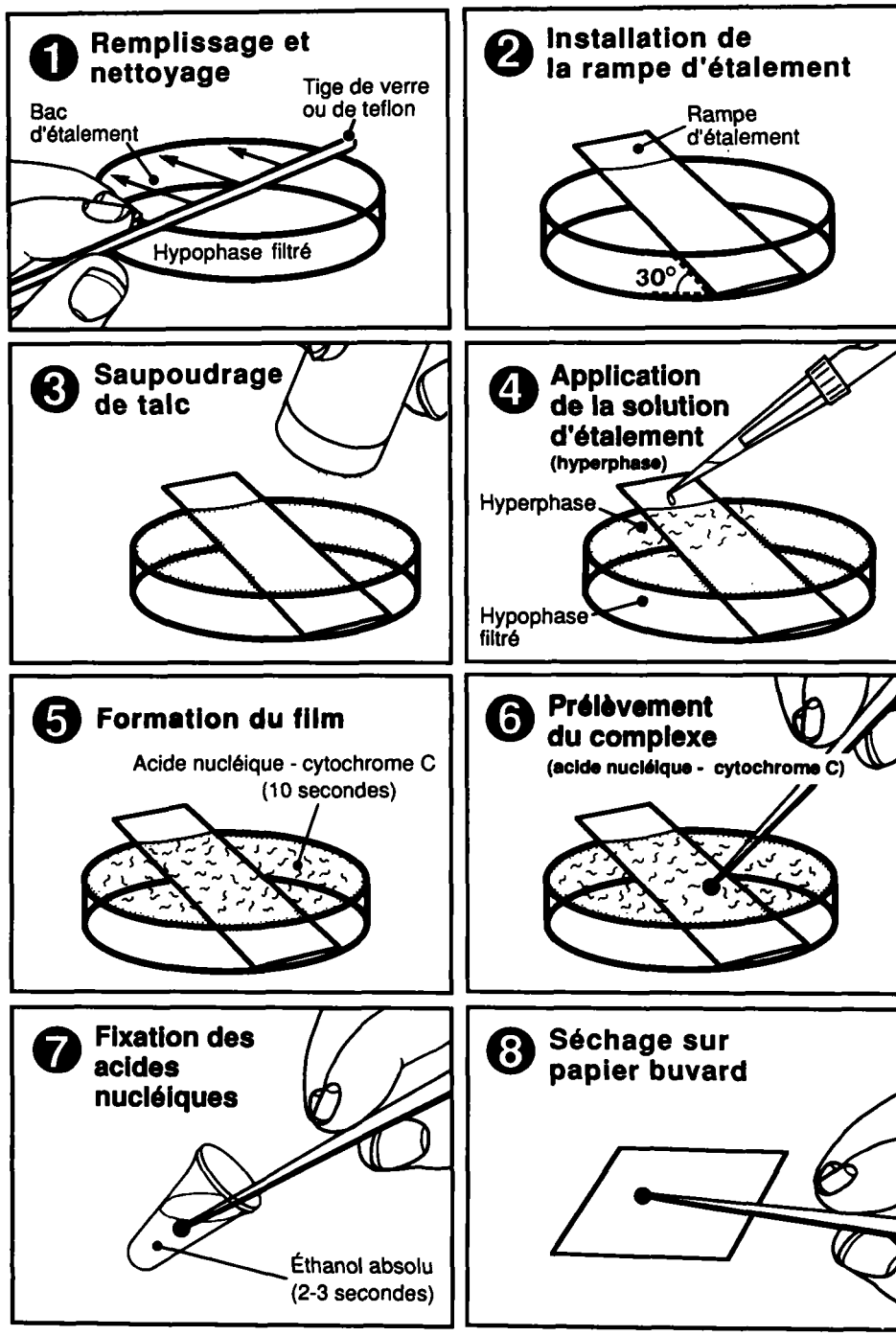


Figure 1

Méthode d'étalement d'acides nucléiques

2. MATÉRIEL

2.1. ACIDES NUCLÉIQUES

L'ADN ou l'ARN viral à étudier au microscope électronique peut être isolé selon les méthodes usuelles telle que l'extraction au phénol (Mandel et Hershey 1960). L'ADN, après son extraction, peut être conservé dans une solution contenant du tampon phosphate 0.01 M et de l'EDTA 1 mM (pour inhiber les nucléases), ou 0.1 SSC (NaCl 0.15 M, citrate de sodium 0.015 M, pH 7), ou du NaCl 0.02 M et EDTA 1 mM (pH 7), à 4°C pendant plusieurs semaines. L'ARN précipité à l'éthanol peut être resuspendu dans du tampon TEN (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.01 M, EDTA 1 mM) et 0.1 SSC, ou dans 1 mM de dithiothréitol (DTT) (pH 7) et congelé le plus rapidement possible à –70°C en petits aliquots afin de prévenir une dégradation possible par des ribonucléases (Evenson 1977).

2.2. VERRERIE

Tout le matériel de verre ou de plastique doit être extrêmement propre et stérile. Dans l'étude d'un ARN, il est ausi très important de porter des gants pour éviter une contamination possible par les ARNases provenant de la peau.

2.3. SOLUTIONS

Toutes les solutions sans exception doivent être filtrées (filtre de 0.22 µm) avant usage pour éliminer les particules qui pourraient empêcher un bon étalement des molécules d'acide nucléique.

2.4. GRILLES PORTE-OBJET

Les grilles peuvent être en cuivre ou en nickel. Elles peuvent avoir de 50 à 400 mesh dépendant de la dimension des molécules et de la force du film-support qui les recouvre. Le film-support doit être de très bonne qualité, très résistant aux bombardements des électrons et le plus mince possible pour bien voir les molécules d'acides nucléiques. Il peut être constitué de collodion ou de Formvar recouvert d'une couche de carbone, ou, mieux encore, d'une couche de carbone seulement. Selon Zollinger *et al.* (1977), le film-support de carbone doit avoir 10 à 12 nm d'épaisseur et devrait être utilisé moins d'une semaine après sa préparation. D'autres chercheurs suggèrent de charger positivement le film de carbone pour en améliorer les propriétés attractives. Cette charge est obtenue en soumettant les grilles recouvertes de carbone à des décharges de haut voltage ("glow discharge") sous un vide partiel en présence d'air ou de vapeur d'amylamine (Dubochet *et al.* 1971). D'autres d'auteurs (Ruben et Siegel, 1975) suggèrent d'évaporer de l'aluminium en même temps que le carbone pour former le film, l'aluminium fournissant une charge positive au film.

2.5. CYTOCHROME C

Le meilleur de choix comme film de protéine reste le cytochrome c. Des solutions stock de concentration finales de 0.1% (p/v) peuvent être préparées dans de l'eau ou de l'acétate d'ammonium 0.15 M. Les solutions peuvent être conservées à 4°C pendant plusieurs mois. Après dilution à la concentration désirée, le cytochrome c devrait être filtré à travers un filtre de 0.22 µm. La concentration du cytochrome c utilisé est souvent critique. Au moment de l'étalement sur une hypophase, on utilise généralement un milligramme de protéine par mètre carré (Kleinschmidt 1968).

3. TECHNIQUES DE TRANSFERT

3.1. FILM À BASE DE PROTÉINE

Les techniques les plus courantes pour le transfert des acides nucléiques d'une solution à une grille de microscope électronique sont la méthode d'étalement sur grande surface (Kleinschmidt et Zahn 1959, Zollinger *et al.* 1977), la méthode d'étalement sur une goutte (Kung *et al.* 1975) et la méthode de diffusion, (Lang *et al.* 1964, Lang et Mitani 1970).

Dans ces techniques, certains auteurs utilisent une hypophase aqueuse et, d'autres, une hypophase de formamide. La solution aqueuse est utilisée pour la visualisation des molécules bicaténaires sur toute leur longueur. La solution de formamide (Westmoreland *et al.* 1969) est utilisée pour la visualisation des molécules ou des portions monocaténaires dans une molécule duplex (Evenson 1977).

3.1.1. Étalement sur une grande surface

3.1.1.1. ADN ou ARN bicaténaires

Le contraste final et la résolution d'un échantillon sont dépendant de la nature de l'hypophase. Un étalement sur l'eau donne un contraste pauvre par rapport à un étalement sur une hypophase contenant un sel ou de la formamide. Cependant, le contraste est avantagé aux dépens d'un bruit de fond plus élevé et d'une résolution plus faible (Evenson 1977). Zollinger *et al.* (1977) rapportent une modification de la technique classique de Kleinschmidt. Cette nouvelle technique utilise un détergent, le sodium lauryl sarcosinate (SLS) et le cytochrome c avec l'acide nucléique dans l'hyperphase; l'hypophase est constituée d'acétate d'ammonium 0.2 M. Cette technique permet notamment de voir les liens enzymatiques sur des molécules d'ADN très bien étendues.

Préparation de la solution d'étalement

1. Préparer dans un tube:

   Acétate d'ammonium 0.2 M ....0.8 mL

   Cytochrome c 0.1% aqueux ....0.1 mL

   SLS 0.05% .....20 µL

2. Filtrer cette solution sur une membrane de 0.22 µm juste avant utilisation et conserver la solution à 37°C.

Préparation des acides nucléiques

1. Solubiliser l'ADN ou l'ARN à une concentration de 14 µg/mL et maintenir à 37°C dans un tampon de liaison:

   Tris-HCl pH 7.9 .....10 mM

   NaCl.....50 mM

   $MgCl_2$ .....10 mM

   Dithiothréitol .....0.2 mM

   EDTA.....0.1 mM

2. Diluer 50 µL de l'échantillon avec 6 volumes du tampon de liaison, maintenir à 37°C à une concentration de 2 µg/mL et conserver le reste de l'échantillon à 37°C.

Étalement de l'ADN (Figure 1)

1. Remplir le bac d'étalement (un Petri stérile en plastique de 60 x 20 mm peut être utilisé) avec de l'acétate d'ammonium 0.2 M préfiltré à 25°C (hypophase).

2. Passer rapidement et plusieurs fois une tige de verre ou de Téflon sur toute la surface de l'hypophase (étape 1).

3. Installer la rampe d'étalement (une lame de verre propre et autoclavée) appuyée sur un côté du Petri et faisant un angle d'environ 30° (étape 2).

4. Ajouter 0.1 mL de la solution d'ADN à 0.92 mL de la solution d'étalement.

5. Repasser la tige de verre et attendre que l'hypophase se stabilise avant de saupoudrer quelques particules de talc près de la rampe à la surface de l'hypophase (étape 3).

6. Après 1 min appliquer lentement 50 µL de l'échantillon sur la rampe pour former une monocouche (étape 4).

7. Dix secondes après l'étalement (étape 5), appliquer une grille-support sur la monocouche au niveau du front de migration délimité par le talc (étape 6).

8. Sécher la grille avec un morceau de papier buvard.

9. Placer la grille 2–3 sec dans une solution d'éthanol absolu (étape 7).

10. Sécher la grille sur un morceau de papier buvard (étape 8).

11. Placer les grilles sur un papier filtre dans une boîte de Petri pour un séchage final.

12. Ombrager rotativement les échantillons à un angle d'environ 7° avec une épaisseur de 3.5–4.0 nm de platine.

13. Observer au microscope électronique et photographier (Figure 2).

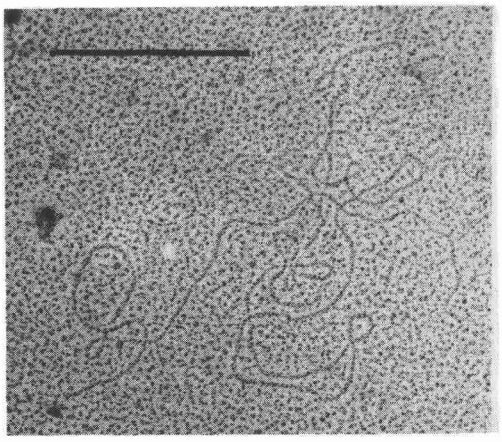


Figure 2

Molécule d'ADN du cytomégalovirus étalé selon la technique de Zollinger *et al.* (1977) (Échelle = 100 nm)

3.1.1.2. ARN monocaténaire

Les ARN monocaténaires étalés selon la technique aqueuse (avec une hypophase constituée d'eau, d'acétate d'ammonium ou de tampon Tris-HCl) apparaissent généralement déformés et difficiles à visualiser à cause du bruit de fond dû au cytochrome c. Ainsi, pour améliorer la visualisation et l'extension des molécules, il est préférable de choisir des méthodes utilisant des solutions non-aqueuses et/ou des dénaturants. La méthode de Zollinger *et al.* (1977), décrite plus haut, peut être aussi appliquée à l'ARN monocaténaire, à condition que la solution d'étalement contienne du formamide à une concentration de 70% (Lalague *et al.* 1984). Il existe d'autres méthodes utilisant le glyoxal formamide (Kung *et al.* 1974, 1975), le formaldéhyde-formamide (Chi et Bassel 1974) et l'urée-formamide (Robberson *et al.* 1971). Cette dernière méthode est décrite ci-après.

1. Diluer l'ARN (10-15 µg/mL) dans du tampon TEN (NaCl 0.15 M, Tris-HCl 0.01 M , EDTA 1 mM).

2. Diluer 1 µL du mélange d'ARN dans 40 µL d'une préparation fraîche contenant 1.2 g d'urée ultrapure dans 4.2 mL de formamide.

3. Chauffer ce mélange contenu dans un microtube à 53°C pendant 30 sec.

4. Refroidir sur glace pendant 2 min.

5. Diluer le cytochrome c (0.5 mg/mL) dans un tampon Tris 0.5 M, pH 8.5 et EDTA 0.05 M.

6. Ajouter 5 µL de la solution de cytochrome c à la solution d'ARN.

7. Prélever 40 µL de ce mélange pour l'étalement.

8. Faire l'étalement sur une hypophase constituée de Tris 0.15 M à pH 8.5 dans un bac entouré de glace.

9. Le reste de l'étalement est effectué tel que décrit précédemment.

3.1.2. Étalement sur une goutte

Lorsqu'il s'agit d'étaler un petit volume à faible concentration d'acides nucléiques, il est possible de miniaturiser les techniques d'étalement décrites précédemment. Ainsi, le bac d'étalement devient une simple feuille de paraffine sur laquelle on applique une goutte d'environ 100 µL de l'hypophase choisie. À l'aide d'une micropipette, il faut ajouter délicatement à la surface une goutte d'environ 5 µL de la solution d'étalement. Un film d'acide nucléique-protéine se forme en quelques secondes et une grille-support est appliquée délicatement à la surface de la goutte pour le recueillir. Celle-ci est ensuite séchée et contrastée selon la méthode de son choix.

Pour permettre un bon étalement sur la goutte, Kung *et al.* (1975) suggèrent de laisser couler la solution d'étalement sur une tige de verre (0.3 cm de diamètre avec un bout arrondi et fin) ou une pipette Pasteur à bout scellé. Celle-ci est maintenue à un angle de 45° à 60° dans l'hypophase. La surface peut être légèrement réduite en retirant l'hypophase à l'aide d'une seringue.

3.1.3. Méthode de diffusion

Lang *et al.* (1964) ont décrit une méthode utilisant aussi un film de cytochrome c, la méthode de diffusion. Par la suite, celle-ci a été miniaturisée sur microgoutte (Lang 1972). Elle consiste à étaler un film de cytochrome c à la surface d'une solution de 0.2 M d'acétate d'ammonium contenant aussi peu que 5×10^{-8} µg/mL d'ADN. Après une attente de 10–20 min, l'ADN a diffusé à la surface du film et est irréversiblement absorbé à la surface. Une grille-support est alors mise en contact avec la surface, lavée, séchée et contrastée ou ombragée.

Cette technique est très rapide, simple et permet de varier la concentration d'acide nucléique par aire de surface du film en augmentant ou en diminuant le temps de diffusion des molécules à la surface. La quantité d'acides nucléiques absorbés sur le film protéique est proportionnelle au temps (Lang et Mitani, 1970).

3.2. TECHNIQUE SANS PROTÉINE

Étant donnée la dimension du cytochrome c (environ 10 nm de diamètre) qui entoure les acides nucléiques, il est difficile de bien voir les petits détails structuraux avec la technique de monocouche protéique. Vollenweider *et al.*

(1975) ont donc développé une technique d'étalement où le cytochrome est remplacé par un composé de plus faible masse moléculaire, le chlorure de benzyl--diméthyl-alkyl-ammonium (BAC). Celui-ci est ajouté à la solution d'étalement à une concentration finale de 0.005% avec le tampon et l'acide nucléique. Cette méthode donne des résultats variables (Evenson 1977), mais elle permet notamment de bien visualiser les complexes acide nucléique-protéine, par exemple un complexe ARN polymérase d'*E. coli*--ADN du bactériophage T7 (Vollenweider *et al.* 1975).

4. COLORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES

4.1. COLORATION DES ACIDES NUCLÉIQUES À L'ACÉTATE D'URANYLE

La meilleure méthode permettant de bien visualiser les acides nucléiques est, sans contredit, l'ombrage à l'aide d'un métal évaporé. Les laboratoires ne possédant pas d'évaporateur peuvent contraster les acides nucléiques en les colorant à l'acétate d'uranyle (Evenson 1977):

1. Préparer une solution stock d'acétate d'uranyle 0.05 M dans 90% d'éthanol et 0.05 M HCl.
2. Diluer la solution stock 1:100 à 1:1000 dans 90% d'éthanol.
3. Filtrer la solution avant usage.
4. Rincer la grille contenant les acides nucléiques pendant 10-30 sec dans l'éthanol (90% ou plus) pour enlever les sels minéraux.
5. Placer la grille dans le colorant pendant 30 à 60 sec.
6. Rincer 10 sec dans l'éthanol à 90%.
7. Sécher à l'aide d'un morceau de papier buvard.
8. Examiner au microscope électronique ou ombrager d'abord avec un métal évaporé.

4.2. TECHNIQUE D'OMBRAGE

Bien que les acides nucléiques monocaténaires et bicaténaires peuvent être visualisés par une coloration seulement, un meilleur contraste peut être obtenu en ombrageant le spécimen obliquement avec un métal lourd immédiatement après la coloration et la déshydratation. Pour distinguer entre une molécule monocaténaire et bicaténaire, l'ombrage seul donne une plus grande résolution que le colorant seul.

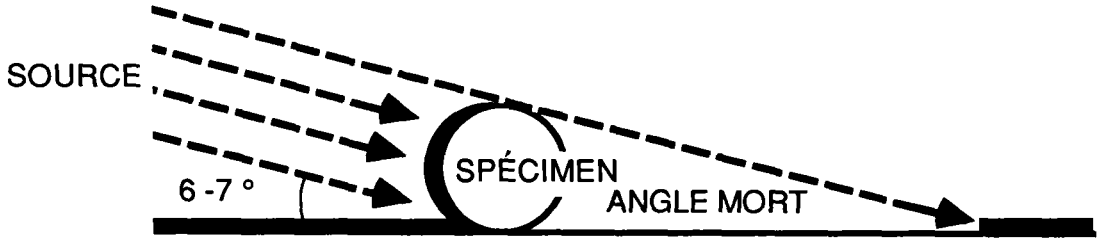


Figure 3

Schéma montrant la zone protégée (angle mort) lorsque le spécimen est soumis à une évaporation métallique

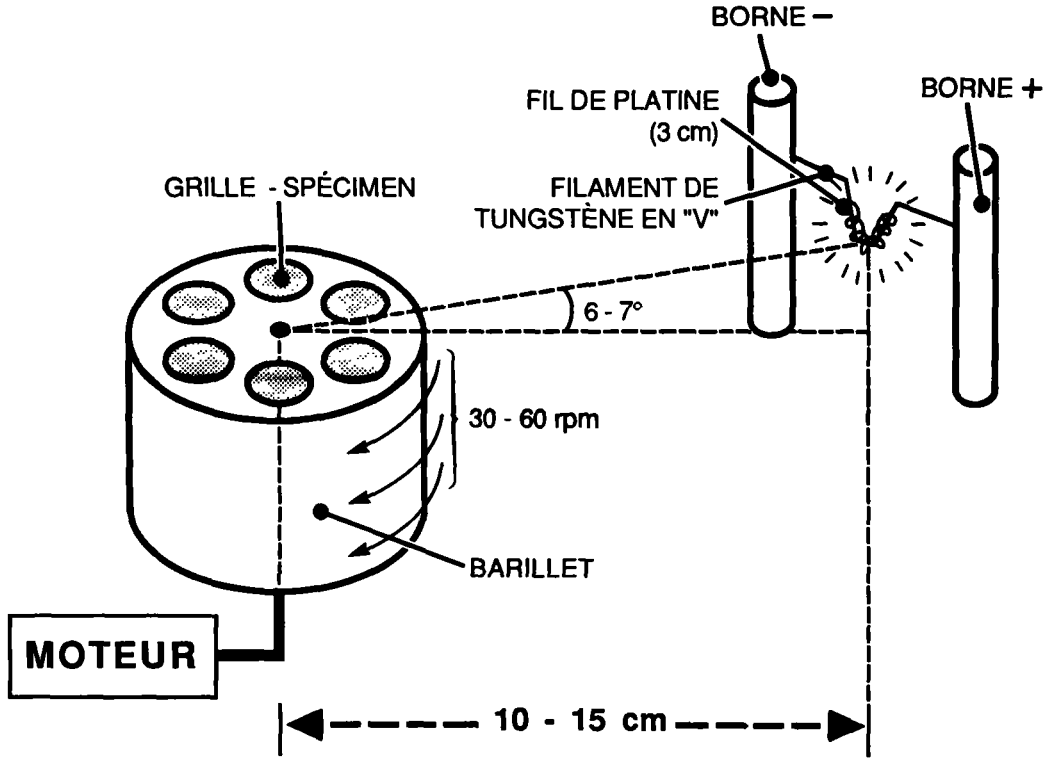


Figure 4

Schéma montrant la technique d'ombrage rotatif

La technique d'ombrage consiste à déposer par évaporation dans une cloche, sous vide (inférieur à 10^{-4} torr), une couche de matériel opaque aux électrons sur une grille contenant le spécimen à un certain angle (environ 6 à 7°). Les régions masquées (angle mort) par les irrégularités de surface ne sont pas contrastées (Figure 3). Pour contourner cet inconvénient, les grilles contenant les échantillons sont placées sur une plaque continuellement en rotation (30–60 rpm) au cours de l'évaporation: c'est l'ombrage rotatif (Figure 4).

La source d'évaporation est généralement constituée d'un bout de fil de métal de 3 cm ou d'alliage de métal (platine, platine-palladium, etc.) enroulé autour d'un fil de tungstène en torsade ou en forme de "V", ou autour d'une tige de carbone. Cet assemblage est situé à 10-15 cm de l'échantillon et est relié à une source de courant.

La résolution du matériel évaporé est dépendante du degré de vide atteint durant l'évaporation. Il est donc très avantageux d'obtenir un vide de moins de 10^{-4} torr pour l'évaporation. Il est important de d'abord dégazer le filament de tungstène en le chauffant quelques secondes à une température plus basse que son point de fonte, puis de couper le courant. Après l'obtention d'un vide optimal, le filament de tungstène est chauffé jusqu'à ce que le fil de métal qui l'entoure se mette à fondre. On baisse alors un peu le courant et on laisse évaporer aussi longtemps que le filament de tungstène résiste. Les échantillons sont ensuite récupérés et examinés au microscope électronique.

5. DÉTERMINATION DE LA MASSE MOLÉCULAIRE

La microscopie électronique est un outil très utile pour l'évaluation de la masse moléculaire des acides nucléiques. La longueur des acides nucléiques peut varier de 0.01 à 80 μm. Celle d'un même acide nucléique peut aussi différer d'un étalement à l'autre. Il est donc important d'inclure un acide nucléique de masse moléculaire connue comme standard interne. Ce marqueur doit être du même type d'acide nucléique et de dimension semblable, mais il est préférable d'utiliser une molécule circulaire plutôt qu'une molécule linéaire. S'il est difficile de distinguer les molécules expérimentales des molécules-marqueurs, celles-ci peuvent être étalées séparément, mais immédiatement après les molécules expérimentales, de sorte que les conditions d'étalement soient presque identiques (Evenson 1977).

Les molécules peuvent être mesurées à l'aide d'un curvimètre ou d'un stylo électronique sur une impression photographique, le microscope électronique ayant été préalablement et adéquatement calibré.

La masse moléculaire d'une molécule inconnue est déterminée par le rapport entre sa longueur et la longueur d'une molécule de masse moléculaire connue. Généralement, la masse par unité de longueur est d'environ 2×10^6 Da/μm pour une molécule bicaténaire, et de 1.2×10^6 Da/μm pour une molécule monocaténaire (Evenson 1977)

6. RÉFÉRENCES

Chi, Y.Y. et Bassel, A.R. 1974. Electron microscopy of viral RNA: Molecular weight determination of bacterial and animal virus RNAs. J. Virol. 13: 1194-1199.

Dubochet, J., Ducommun, M., Zollinger, M. et Kellenberger, E. 1971. A new preparation method for dark-field electron microscopy of biomacromolecules. J. Ultrastruct. Res. 35: 147.

Evenson, D.P. 1977. Electron microscopy of viral nucleic acids. Meth. Virology 6: 219-264.

Fisher, H.W. 1981. Use of electron microscopy in virology. Compr. Virology 17: 83-127.

Kleinschmidt, A.K. 1968. Monolayer techniques in electron microscopy of nucleic acids molecules. Meth. Enzymol. 12B: 361-371.

Kleinschmidt, A.K. et Zahn, R.K. 1959. Uber desoxyribonucleinsaure-molekulen in protein mischfilmen. Z. Naturforsch., 14B: 770.

Kung, H.J., Bailey, J.M., Davidson, N. , Vogt, P.K., Nicolson, M.O. et McAllister, R.M. 1974. Electron microscope studies of tumor virus RNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39: 827-836.

Kung, H.J., Davidson, N., Nicolson, N.O. et McAllister, R.M. 1975. Structure subunit composition and molecular weight of RD-114 RNA. J. Virol. 16: 397.

Lalague, E.D., Corvellec, N.R., Dupuy, M. et Cousineau, G.H. 1984. Microscopie électronique à transmission des acides désoxyribonucléiques (DNA) et ribonucléiques (RNA). Dans *Biologie moléculaire.* Librairie des Presses de l'Université de Montréal, Montréal, pages 89-98.

Lang, D. 1972. Nucleic acid molecules prepared by monolayer techniques. Dans *Proc. 30th Ann. Mtg. E.M.S.A.* (C.J. Arceneaux, Edit.), Claitor's Publishing Division. Baton Rouge, pages 178-179.

Lang, D. et Mitani, M. 1970. Simplified quantitative electron microscopy of biopolymers. Biopolymers 9: 373.

Lang, D., Keinschmidt, A.K. et Zahn, R.K. 1964. Konfiguration und langenverteilung von DNA-molekulen in losung. Biochim. Biophys. Acta 88: 142.

Mandel, J.D. et Hershey, A.D. 1960. A fractionating column for analysis of nucleic acids. Anal. Biochem. 1: 66.

Robberson, D., Aloni, Y., Attardi, G. et Davidson, N. 1971. Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. VI. Size determination of mitochondrial ribosomal RNA by electron microscopy. J. Mol. Biol. 60: 473-484.

Ruben, G., et Siegel, B.M. 1975. Thin carbon-aluminium films for dark-field electron microscopy of DNA. Proc. 32th Annual E.M.S.A. Meeting. 66: 658.

Stokrova, J., Korb, J. et Riman, J. 1982. Studies on the structure of avian myeloblastosis virus (AMV) RNA I. Factors affecting electron microscopic visualization of AMV RNA. Acta Virol. 26: 1-11.

Volleinweider, H.J., Sogo, J.M. et Koller, T.H. 1975. A routine method for protein-free spreading of double and single-stranded nucleic acid molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 83.

Westmoreland, B.C., Szybalski, W. et Ris, M. 1969. Mapping of deletions and substitutions in heteroduplex DNA molecules of bacteriophage λ by electron microscopy. Science 163: 1343.

Zollinger, M., Guertin, M. et Mamet-Bratley, M.D. 1977. A new electron microscopic method for studying protein-nucleic acid interactions. Anal. Biochem. 82: 196-203.

30

HYBRIDATION MOLÉCULAIRE

Max Arella et J. Arnold Verbeek

1. INTRODUCTION

Nous allons traiter dans ce chapitre des trois principales techniques d'hybridation moléculaire pouvant être utilisées en virologie pour rechercher:

- des colonies bactériennes ayant incorporé des insertions (ADN génomique ou ADN complémentaire)
- des fragments spécifiques d'ADN viral obtenus après coupure par différentes enzymes de restriction (hybridation de type "Southern")
- la présence et la taille d'un ARNm correspondant à un gène d'intérêt (hybridation de type "Northern").

Chacune de ces trois techniques fera l'objet d'une brève introduction ainsi que d'une description détaillée des étapes expérimentales à suivre pour leur réalisation. De plus nous décrirons des méthodes simples pour la détection de virus.

2. HYBRIDATION *IN SITU* DE COLONIES BACTÉRIENNES

Cette technique permet le criblage rapide de colonies bactériennes par hybridation ARN-ADN ou ADN-ADN afin de rechercher des séquences spécifiques d'ADN clonées dans des plasmides (Grunstein et Hogness 1975). En bref, elle consiste à faire croître en double sur des feuilles de nitrocellulose des colonies bactériennes, d'en effectuer une réplique (plaque maîtresse) gardée à 4°C et de lyser directement les cellules se trouvant sur le filtre. L'ADN des bactéries est dénaturé *in situ* sans déloger les cellules de leur site initial. Par la suite, de l'ADN ou de l'ARN marqué est utilisé comme sonde pour hybrider ces filtres, avant de procéder à des lavages et à l'autoradiographie, révélant les colonies contenants les séquences de l'ADN recherché et, par conséquent, les colonies de la plaque maîtresse ayant ces mêmes séquences. Ces colonies positives de la plaque maîtresse doivent rapidement être conservées par congélation ou en culture

penchées ou utilisées dans les procédés d'amplification des plasmides. Ce procédé d'hybridation *in situ* des colonies bactériennes a été modifié par plusieurs chercheurs afin de pouvoir effectuer un criblage des clones dans le bactériophage lambda (Benton et Davis 1977). Il a également été possible de combiner les avantages d'un clonage dans des plasmides ou le bactériophage lambda par la lyse partielle des bactéries lysogènes pour un bactériophage thermoinductible. Ceci permet le criblage d'un nombre important de colonies et rend inutile l'utilisation de la plaque maîtresse (Canu et Kaurilsky 1978).

2.1. MÉTHODE

2.1.1. Fixation et dénaturation sur papier filtre

La méthode que nous présentons dans cette section (Gergen *et al.* 1979) est simplifiée par rapport à la méthode originale de Grungstein et Hogness (1975).

1. Permettre une croissance des colonies bactérienne jusqu'à un diamètre de 1 à 4 mm. Elles sont transférées sur du papier filtre de type Whatman 541 déposé sur les colonies et incubé à 37°C pendant 2 h. Il est important d'empêcher la formation de bulles d'air entre le papier et la surface d'agar.

2. Si les plasmides utilisés pour la transformation sont du type relâché pour le contrôle de leur réplication, il est possible de procéder à une amplification en transférant le papier filtre, directement sur du milieu Luria (LB) contenant 250 µg/mL de chloramphénicol et en poursuivant l'incubation pendant 12-24 h à 37°C.

3. Lyser les colonies bactériennes, dénaturer et immobiliser l'ADN par deux lavages successifs de 5 min dans les solutions suivantes:

   - NaOH ..... 0.5 M

   - Tris-HCl, pH 7.4 ..... 0,5 M

   - 2X SSC, pH 7

4. Laver brièvement dans 95% éthanol et sécher à l'air. Les filtres Whatman 541 ont la propriété de fixer rapidement l'ADN et ils peuvent être utilisés sans nécessiter d'autres traitements pour la pré-hybridation et l'hybridation.

2.1.2. Fixation et dénaturation sur membrane de nitrocellulose

1. Déposer des filtres de nitrocellulose stériles sur une boîte de Petri contenant du milieu nutritif et les antibiotiques appropriés, choisis selon le type de plasmide utilisé. Le filtre doit être mouillé complètement par capillarité à la surface de l'agar.

2. Isoler les colonies d'une transformation et les inoculer sur une nouvelle plaque et sur le filtre de nitrocellulose. Cette opération est réalisée par l'intermédiaire de cure-dents en bois préalablement stérilisés et en prenant soin de ne pas dépasser 50 colonies sur un filtre de 10 cm de diamètre afin d'éviter de mélanger les colonies au cours des d'étapes ultérieures.

3. Incuber les boîtes de Petri renversées à 37°C. Les plasmides relâchés peuvent être ultérieurement amplifiés en transférant pendant 12-24 h les filtres de nitrocellulose sur un milieu contenant 250 µg/mL de chloramphénicol.

4. Lyser les colonies et dénaturer l'ADN en transférant successivement les

filtres de nitrocellulose, les colonies bactériennes sur la partie supérieure, sur trois épaisseurs de papier Whatmann 3MM préalablement imbibé dans les solutions suivantes:

- NaOH 0.5 M (8 min ou plus jusqu'à ce que les colonies aient pris une apparence luisante)
- Tris-HCl 1M pH 7.5 (3 min à répéter une ou deux fois pour neutraliser la solution alcaline)
- Tris-HCl 0.5 M pH 7.5, NaCl 1.5 M

5. Sécher délicatement les filtres de nitrocellulose sur du papier Whatmann 3 MM.

6. Tremper les filtres dans de l'éthanol absolu (attention: cette étape est facultative et certains filtres de nitrocellulose ne sont pas résistants à l'éthanol, si c'est le cas passer directement à l'étape 7).

7. Tremper les filtres 5 fois dans le chloroforme pour extraire les lipides bactériens.

8. Sécher les filtres sur du papier Whatmann 3 MM.

9. Tremper les filtres dans NaCl 0.3 M pendant 3 min.

10. Sécher à la température ambiante et cuire sous vide à 80°C pendant 2 h avant de procéder à la pré-hybridation et l'hybridation.

Il est important de noter que les membranes de nitrocellulose, après la cuisson sous vide, sont extrêmement friables et, il faut les manipuler avec beaucoup de précaution.

3. HYBRIDATION DE TYPE "SOUTHERN"

Ce type d'hybridation vise la recherche de fragments spécifiques d'ADN viral et/ou chromosomique, obtenus après coupure par des enzymes de restriction. La mise au point et les applications de cette méthode ont été décrites par Southern (1975, 1979).

Brièvement, après coupure par une enzyme de restriction, les fragments d'ADN sont séparés en gel d'agarose ou, si les fragments sont de petite taille, en gel de polyacrylamide (Maniatis *et al.* 1982). Après dénaturation de l'ADN et transfert par capillarité ou par électrophorèse, sur des filtres de nitrocellulose ou de nylon (Bittner *et al.* 1980, Stellway *et al.* 1980, Smith *et al.* 1984) à l'aide de la sonde spécifique l'ADN sera détecté.

3.1. FRACTIONNEMENT DE L'ADN

Les fragments d'ADN sont fractionnés sur gel d'agarose ou d'acrylamide selon des protocoles standards.

Afin d'effectuer l'hybridation de type Southern, il est essentiel de déposer dans chaque puits environ 0.5 µg d'ADN d'un bactériophage lambda recombinant, 0.2 µg d'un plasmide et jusqu'à 10 µg d'ADN total de mammifères (génome haploïde de 3 x 10^9 paires de bases) si l'on veut détecter une séquence unique sur le génome.

Après coloration au bromure d'éthidium, les portions inutiles des gels peuvent être éliminées à l'aide d'un scalpel.

3.2. PRÉPARATIONS POUR LE TRANSFERT SUR FILTRES

Les filtres de nitrocellulose ou de nylon doivent être manipulés avec des pinces ou des gants.

3.2.1. Nitrocellulose

Les filtres de nitrocellulose sont d'abord immergés dans l'eau distillée (s'il reste des surfaces non imbibées, utiliser de l'eau bouillante).

Les filtres sont trempés dans du tampon 20X SSC ou 20X SSPE ou 1M NH_4 OAc (section 8).

3.2.2. Nylon

Les filtres de nylon sont imbibés dans l'eau et, par la suite, dans le tampon de transfert approprié.

3.3. FRAGMENTATION ET DÉNATURATION DE L'ADN

Les étapes de cette section sont identiques pour préparer un transfert sur nitrocellulose ou nylon.

1. Après électrophorèse, les gels sont immergés dans du HCl 0.25N (500 mL pour un gel de 200 mL) pendant 8-10 min à la température ambiante et sous agitation lente. Cette étape n'est pas nécessaire si l'on utilise des oligonucléotides comme sondes moléculaires.

2. Les fragments sont ensuite dénaturés dans le gel. Rincer dans l'eau distillée (2 min), tremper dans deux bains de 15 min (2 mL de NaCl 1 M NaOH 0.3 M par mL de gel), sous agitation lente. Neutraliser le gel par trempage (2 x 15 min) dans soit: 0,5 M Tris-HCl (pH 7,4); 1,5 M NaCl soit: 1 M NH4 OAc (pH 7,0). Ou, si l'on désire effectuer un transfert électrophorétique, dans les tampons TAE ou TBE (2 x 5 min) (section 8).

3.4. TRANSFERT ET IMMOBILISATION DE L'ADN

Selon le type de filtre utilisé, il existe différentes approches.

3.4.1. Nitrocellulose

Le filtre de nitrocellulose imbibé (voir section 3.2.1) est déposé sur le gel qui est lui-même plongé dans le tampon (2X SSC). Il est important d'éviter la formation de bulles d'air entre les gels et le filtre de nitrocellulose. Après avoir préparé plusieurs couches de papier Whatmann 3MM, de dimension identique à celle du gel d'agarose, imbibées dans du tampon 2X SSC, replacer à la surface de la nitrocellulose et du gel d'agarose (Southern 1979). Bien tenir en place les différentes couches de papier par un poids suffisant qui n'écrase pas le gel. Sous ces conditions, le transfert requiert approximativement 1 à 2 h, mais, il peut être prolongé toute la nuit.

Après cette période, l'efficacité de transfert peut être déterminée par coloration des gels avec 0.5 µg/mL de bromure d'éthidium.

L'immobilisation de l'ADN sur la nitrocellulose se fait après avoir séché celle-ci entre 2 feuilles de papier Whatmann 3MM et utilisé un four à vide à 80°C pendant 20 min à 2 h. Les filtres ainsi desséchés peuvent être entreposés à 4°C pendant 6 mois ou plus. A titre d'exemple de ce type de transfert voir la Figure 1.

3.4.2. Nylon

Le transfert par capillarité sur filtre de nylon se fait essentiellement de la même façon que sur nitrocellulose. Cependant, il est recommandé d'utiliser les tampons de transfert 10X SSPE ou SSC, même si des concentrations de 1 à 5X SSPE peuvent s'avérer efficaces.

Le transfert électrophorétique se fait dans du tampon 1X TAE ou 1X TBE (utiliser le type de tampon ayant servi à l'électrophorèse). La préparation du gel et du filtre de nylon à l'intérieur des supports est semblable à celle qui a été utilisée pour les transferts électrophorétiques des protéines avec le filtre situé à proximité de l'anode. Il faut appliquer environ 10V/cm pendant 30 min et passer ensuite à 40 V/cm pendant 2 h à une température de 4°C. Après le transfert, laver les filtres dans 5X SSPE à 60°C pendant 5 min et cuire pendant 30 min à 65-80°C pour immobiliser l'ADN. L'utilisation d'un four à vide n'est pas nécessaire pour ce type de membrane. Alternativement, l'immobilisation de l'ADN peut se faire à l'aide d'une source de rayons UV (254 nm) telle que celle émise par une lampe germicide ou un transilluminateur. L'exposition totale doit être de 1,6 KJ/m^2 pour les membranes sèches. Les filtres de nylon peuvent être entreposés à 4°C pendant 6 mois ou plus.

Une technique additionnelle peut également être employée pour certaines membranes de nylon exposées à des tampons alcalins (Chomezynski et Quasba 1984). Selon ce procédé, les membranes sont imbibées d'eau distillée et ensuite saturées dans le tampon de transfert (0.4 M NaOH/ 0.6 M NaCl). Le gel d'agarose ou d'acrylamide est plongé deux fois pendant 15 min dans ce tampon de transfert en utilisant 3-4 mL de ce tampon par mL de gel. Les gels peuvent nécessiter un pré-traitement de 10 min dans du HCl 0.25 M lorsque les fragments d'ADN à séparer sont d'une taille importante (> 10 Kpb).

Les fragments sont ensuite transférés sur nylon avec le tampon sus-mentionné par la technique de capillarité (section 3.4.1). La membrane de nylon doit successivement être neutralisée dans du Tris-HCl 0,5 M (pH 7.0)/NaCl 0.1 M pendant 10-15 min à température ambiante, puis séchée ou traitée aux UV tel que décrit précédemment (section 3.4.2).

4. HYBRIDATION DE TYPE "NORTHERN"

Ce type d'hybridation concerne le fractionnement, le transfert, la fixation et l'analyse de la taille des ARN séparés sur des gels contenant des dénaturants tels que le glyoxal, la formaldéhyde ou l'hydroxyde de méthylmercure. La dénaturation complète de l'ARN, par ces trois produits chimiques, permet la mobilité électrophorétique dépendant uniquement de la masse moléculaire. De plus, cette dénaturation facilite l'élution et l'immobilisation sur la membrane (Bailey et Davidson 1976, Thomas 1980, Carmichael et McMaster 1980, Lehrach *et al.* 1977). La coloration des gels à l'acridine orange n'inhibe pas le transfert de l'ARN (Carmichael et McMaster 1980), cependant les processus de décoloration permettant l'utilisation du bromure d'éthidium peuvent interférer avec l'élution de l'ARN.

4.1. FRACTIONNEMENT DE L'ARN

L'ARN doit être fractionné en des gels d'agarose (0.8 à 1,5% avec une épaisseur pouvant varier entre 3 et 5 cm). Alternativement, des gels d'acrylamide contenant de l'urée peuvent être utilisés. La

coloration des gels se fait avec 33 µg/mL d'acridine orange préparé dans 10 mM NaPO4 (pH 6.5), et la décoloration dans ce même tampon (3 fois 20 min).

4.1.1. Gels de glyoxal

Incuber l'échantillon d'ARN dans du glyoxal 1M/ $NaPO_4$ 10 mM (pH 6.5), pendant 60 min à 50°C. Ajouter 1/10 de volume de tampon d'échantillon 10X (0.3% bleu de bromophénol, 50% glycérol, EDTA 20 mM). Réaliser l'électrophorèse dans du $NaHPO_4$ 10 mM (pH 6.5) à 25-30V pendant la nuit, en effectuant une recirculariasation du tampon, ou pendant 6 h à 90V (4.5V/cm de longueur de gel).

4.1.2. Gels de formaldéhyde

Toutes les manipulations s'effectuent sous une hotte chimique.

Les échantillons d'ARN sont chauffés à 65°C pendant 5 min dans le formamide 50% /formaldéhyde 2.2 M dans du tampon MOPS. Refroidir à la température ambiante et faire l'électrophorèse dans du tampon d'échantillon 1X. Le gel utilisé est constitué de 1% agarose dans du tampon MOPS et formaldéhyde 2.2 M (3,5V/cm de gel pendant 3-4 h). Après l'électrophorèse, rincer le gel dans l'eau distillée.

4.1.3. Gels d'hydroxyde de méthylmercure

Toutes les manipulations s'effectuent sous une hotte chimique.

Les échantillons d'ARN sont suspendus dans de l'eau déionisée stérile avec un volume équivalent de tampon E contenant 10% de glycérol, 0,06% de bleu de bromophénol, hydroxyde de méthylmercure 10 mM. L'agarose est préparé dans l'eau distillée; lorsque la température de l'agarose est à 50°C ou moins, ajouter 1/10 du volume final du tampon E. Ajouter 1/10 à 1/20 du volume d'hydroxyde de méthylmercure 100 mM pour obtenir une concentration finale de 5 à 10 mM. L'électrophorèse se fait à 15-25V pendant 17 à 20 h avec recirculation du tampon.

4.2. PRÉPARATIONS POUR LES TRANSFERTS SUR FILTRES

Contrairement à la technique de Southern, pour le transfert d'ARN sur filtres de nitrocellulose ou de nylon, il n'est pas nécessaire de pré-traiter les gels d'agarose ou d'acrylamide. Cependant il est conseillé de garder ceux-ci dans des conditions d'hypotonicité pour créer un front de sels aidant l'élution (Thomas 1977).

4.2.1. Nitrocellulose

Les filtres sont préparés tel que décrit à la section 3.2.1 et sont ensuite immergés dans 20X SSC jusqu'à l'utilisation.

4.2.2. Nylon

Les filtres sont préparés tel que décrit à la section 3.2.2 et sont ensuite immergés dans le tampon 10X SSPE ou SSC, si l'on utilise le transfert par capillarité, ou dans 1X TAE, pour le transfert électrophorétique.

4.3. TRANSFERT ET IMMOBILISATION DE L'ARN

Selon le type de filtre utilisé, les méthodologies applicables (capillarité ou électrophorétique) sont semblables à celles décrites pour l'ADN (sections 3.4.1 et 3.4.2). L'ARN étant très sensible à l'hydroxyde de sodium, le transfert en milieu alcalin est à proscrire (section 3.4.2).

L'immobilisation est également effectuée tel que décrit pour l'ADN; cependant, il

est possible de réduire le bruit de fond en traitant les membranes à la chaleur ou aux UV dans 1X SSC (0.1% SDS à 65°C pendant 1 h), après immobilisation.

5. HYBRIDATION

La spécificité de l'hybridation dépend de plusieurs facteurs, notamment des conditions d'incubation de la sonde sur les filtres et des conditions des lavages subséquents. La température, la force ionique du tampon ainsi que la présence de détergents ou d'agents bloquants affectent le degré de réassociation entre la sonde et la cible. Une revue complète des stratégies d'hybridation a récemment été publiée (Hames et Higgins 1987). Les étapes de pré-hybridation servent à bloquer les sites actifs qui peuvent fixer les sondes libres. La pré-hybridation permet également d'équilibrer les filtres avec la solution d'hybridation, ce qui diminue le bruit de fond dû à l'attachement non spécifique de la sonde. Les solutions protéiques telles que que le réactif de Deinhardt, servent à prévenir l'attachement des sondes sur la surface du filtre non occupée par les molécules d'acides nucléiques. D'autres réactifs tels que le SDS, l'ARN ou l'ADN hétérologues ont pour fonction de diminuer l'hybridation aléatoire des sondes sur des séquences non complémentaires, ainsi que le bruit de fond dépendant de l'hybridation avec l'ARN (Deinhardt 1966, Jeffreys et Flavell 1977).

5.1. HYBRIDATION AVEC DES SONDES RADIOACTIVES

(^{32}P, ^{35}S) D'ADN

Les sondes sont préparées par coupure substitution ou à l'aide amorces aléatoires. Il faut utiliser approximativement 100 µL de sonde par cm^2 de filtre.

5.1.1. Pré-hybridation

Dans un sac de polyéthylène pouvant être scellé à la chaleur, ou autres contenants équivalents, utiliser 250 µL de tampon de pré-hybridation sans sonde par cm^2 de filtre, pendant 1 à 2 h à 42°C.

Tampon de pré-hybridation

50% formamide déionisé

5X SSPE ou 5X SSC, 50 mM NaPO4 pH 7.4

1-5X Solution de Deinhardt

0.1% SDS

100 à 200 µg/mL d'ADN dénaturé et fragmenté de faible masse moléculaire

50 µg/mL d'ARN poly(A)

(optionnel)

10% de sulfate de dextran (optionnel)

Il est conseillé d'extraire au phénol l'ADN de faible masse moléculaire avant son utilisation.

5.1.2. Hybridation

1. Préparation de la sonde: dénaturer la sonde par l'addition de 0.1 volume de NaOH 1M à 37°C pendant 5 min, ou par chauffage à 100°C pendant 5 min et placer immédiatement dans la glace. Les sondes sont utilisées à une concentration de 5 à 20 ng/mL ou 1 à 5 x 10^6 cpm/mL pour la détection de cible unique ou en faible quantité. Les séquences abondantes peuvent être détectées à partir de 1 à 5 x 10^5 cpm/mL.

2. Addition de la sonde: Remplacer dans le sac de polyéthylène la solution de pré-hybridation par le tampon d'hybridation contenant la sonde dénaturée. Agiter à 42°C pendant 12-24 h (en absence de formamide l'incubation se fait à 68°C). La composition du tampon d'hybridation est identique à celle du tampon de pré-hybridation. Il est à remarquer que le polyéthylène glycol peut être utilisé à la place du sulfate de dextran (Amasino 1986) et que l'héparine ou la gélatine peuvent remplacer la solution de Deinhardt (Singh et Jones 1984, Renart *et al.* 1979).

3. Lavages: Les filtres sont trempés successivement dans 150 mL des solutions suivantes:

   -deux fois dans du 1X SSPE (ou SSC) /SDS 0.1%, pendant 1 à 5 min à la température ambiante

   -deux fois dans du SSPE 0.1% (ou SSC) /SDS 0.1%, pendant 15 min à 42°C. Des conditions plus strictes nécessitent un lavage à 68°C.

   -rincer brièvement dans 0.1X SSPE (ou SSC)

5.2. HYBRIDATION AVEC DES SONDES D'OLIGONUCLÉOTIDES

La température d'hybridation (Th) pour ce type de sondes (entre 14 et 20 résidus) est de 5°C inférieure à la température à laquelle 50% des hybrides, formés entre les oligonucléotides et l'ADN fixé sur la matrice (Tm), et elle dépend de la longueur et la composition en bases de l'oligomère (Suggs *et al.* 1981).

Th = Tm - 5°C

= [2°C (nombre A-T) + 4°C (nombre G-C)] - 5°C

Les hybrides d'oligonucléotides non complémentaires sont plus facilement destabilisés par des températures élevées et une faible force ionique, ainsi la température d'incubation est le facteur critique pour une détection valable. Il est important de noter que des concentrations élevées de certains tampons (type Deinhardt) peuvent empêcher l'hybridation avec des oligonucléotides et qu'il est parfois nécessaire d'en modifier les concentrations selon ses applications. Par ailleurs, 0.5% de Nonidet P-40 peut remplacer le SDS et l'addition du sulfate de dextran ne changera pas la vitesse d'hybridation à cause de la faible taille des sondes utilisées. Pour le marquage radioactif de ce type de sonde il est conseillé d'utiliser la terminal-transférase, la polynucléotide kinase ou une méthode d'extension d'amorce (Collins et Hunsaker 1985).

5.2.1. Pré-hybridation

Utiliser le procédé décrit à la section 5.1.1

La pré-hybridation se fait au Th de l'hybride pendant 30 à 60 min dans:

6X SSPE

0.5% SDS

5X solution de Denhardt

5.2.2. Hybridation

1. Remplacer le tampon de pré-hybridation avec le même tampon additionné de:

   100-200 µg/mL d'ARN de transfert

   3-5X solution de Deinhardt

2. Hybrider pendant 12 à 243 heures avec la sonde (10^6 - 10^7 cpm/mL) à la

température déterminée (Th) selon la formule indiquée à la section 5.2.

3. Les filtres sont lavés successivement (3 fois) dans 2X SSPE/ 0.1% SDS à température ambiante pendant 20 min, suivis d'un dernier lavage au Th de l'hybride.

5.3. HYBRIDATION AVEC DES SONDES D'ARN

Les duplex ARN/ADN sont plus stables que les duplex ADN/ADN, ce qui nécessite des conditions strictes d'hybridation afin d'éliminer l'attachement non spécifique des sondes d'ARN sur l'ADN immobilisé.

De plus, il faut manipuler avec grandes précautions afin d'éviter des ARNases pouvant dégrader ce type de sondes. À ce propos, il est déconseillé d'utiliser du lait écrémé pour les solutions de blocage des membranes, à cause de l'énorme quantité d'ARNases contenues dans ce produit. Il est à remarquer que certaines sondes d'ARN peuvent s'hybrider non spécifiquement avec de l'ARN ribosomal et que la concentration de la solution de Deinhardt peut être diminuée avec ce type de sondes.

5.3.1. Pré-hybridation

Les mêmes conditions que pour les sondes d'ADN (section 5.1) sont conseillées à une température de 50-60°C.

5.3.2. Hybridation

1. Les sondes sont dénaturées par la chaleur à 100°C pendant 5 min, avant d'être ajoutées aux mêmes tampons d'hybridation que pour les sondes d'ADN.
2. Lavages: Le bruit de fond peut être éliminé par un traitement successif des filtres par 1 µg/mL d'ARNase A dans 2X SSC pendant 15 min à température ambiante, suivi par des rinçages dans 1X SSC/ 0.1% SDS.

5.4. SONDES BIOTINYLÉES

L'incorporation de nucléotides biotinylés dans des chaînes d'ADN permet d'obtenir des sondes pouvant détecter de l'acide nucléique cible variant entre 2 et 5 pg (Hames et Higgins 1987). Après hybridation, l'incubation des filtres avec des préparations de streptavidine conjuguée à un enzyme, permet la révélation de l'hybridation. Parmi les précautions à prendre avec ce type de sondes citons:

- une forte concentration de la sonde est nécessaire pour une détection acceptable de la cible
- les sondes doivent être dénaturées par la chaleur puisque les solutions alcalines peuvent cliver la biotine

5.4.1. Pré-hybridation

Utiliser les mêmes conditions que la section 5.1.1; cependant il faut ajuster le formamide à 45%.

5.4.2. Hybridation

Ajouter la sonde dénaturée par la chaleur à une concentration de 100-200 ng/mL dans le tampon décrit à la section 5.1.1 contenant 45% de formamide. Après hybridation pendant 12-24 h, effectuer les lavages décrits à la section 5.3.2 puis, deux autres avec du tampon 0.16X SSC/ 0.1% SDS à 50°C pendant 15 min.

6. DÉTECTION DE L'HYBRIDATION ET RÉUTILISATION DES FILTRES

L'utilisation des sondes radioactives permet une détection par autoradiographie selon les procédés usuels. Le temps d'exposition des filtres doit être déterminé empiriquement selon la radioactivité associée aux filtres (estimation au compteur Geiger).

Les sondes radioactives demeureront en permanence sur les filtres, cependant il est possible de les enlever en utilisant les étapes suivantes:

1. Chauffer jusqu'à ébullition le tampon 0.1X SSPE (ou SSC)/ 0.2% SDS; enlever de la source de chaleur et ajouter le filtre pendant 15 min. Répéter ces étapes 1 ou 2 fois.

2. Les filtres peuvent être ré-hybridés immédiatement ou conservés à l'état sec pendant plusieurs mois. Avant de ré-hybrider, tremper les filtres dans 1X SSPE (ou SSC) et suivre les étapes de pré-hybridation usuelles.

7. DÉTECTION DE VIRUS PAR HYBRIDATION

Une application directe de l'hybridation moléculaire en virologie est la détection de préparations virus à partir d'échantillons cliniques ou d'extraits cellulaires. Pour ce faire, il existe sur le marché des appareils qui permettent de déposer en points (dot-blot) ou en fentes (slot-blot) sur des filtres de nylon ou nitrocellulose des préparations brutes d'échantillons, pour ensuite les fixer et les hybrider par une sonde d'acide nucléique homologue complémentaire. En général, si on utilise une sonde radioactive, il n'est pas nécessaire d'extraire l'acide nucléique viral avant de le fixer sur le filtre. Un traitement à la protéinase K (100-500 µg/mL)/ 0.5% SDS suivi d'extractions au phénol/ chloroforme et de précipitations à l'éthanol peut s'avérer nécessaire afin de ne pas saturer les filtres avec des constituants cellulaires ou viraux. Cette méthode peut être réalisée directement à partir des fractions de gradients de saccharose ou de chlorure de césium.

7.1. VIRUS CONTENANT UN GÉNOME D'ARN OU D'ADN MONOCATÉNAIRE

1. Utiliser des membranes de nitrocellulose, préalablement trempées dans 20X SSC (section 3.2.1). Identifier sur la membranes les lieux des dépôts avec un crayon mou de graphite (type 4B).

2. Effectuer, si nécessaire, des dilutions des préparations virales ou des fractions des gradients (nous suggérons un tampon phosphate 50 mM, pH 7)

3. Déposer 5-50 µL de la préparation aux endroits appropriés de la nitrocellulose et permettre l'absorption complète de la solution sur le filtre.

4. Recouvrir avec du papier Whatmann 3MM et cuire au four sous vide à 80°C pendant au moins 2 h.

5. Suivre les étapes de pré-hybridation et hybridation selon le type de sondes à utiliser (voir sections précédentes). L'exemple de ce type d'hybridation est donné aux figures 2 et 3.

7.2. VIRUS CONTENANT UN ARN OU UN ADN BICATÉNAIRE

1. Préparer la nitrocellulose tel qu'indiqué à la section 7.1

2. Prélever 8 µL de préparations virales (ou fractions de gradients) et ajouter 2 µL d'une solution fraîche de 0.5 M NaOH. Laisser à température ambiante 10 min pour l'ADN ou 5 min pour l'ARN.

3. Ajouter 2 µL d'une solution 3M d'acétate de sodium (pH 5.5); si nécessaire diluer les échantillons dans du tampon 1X SSC.

4. Appliquer des volumes de 5-50 µL sur les filtres de nitrocellulose et effectuer les étapes 4 et 5 de la section 7.1.

Il faut noter que pour de l'ADN super enroulé, il faut d'abord effectuer une dépurination par l'ajout de 0.5 M HCl à des aliquotes de 5 µl avant d'utiliser le NaOH (2 µL d'une solution de 3M).

8. SOLUTIONS

20X SSC

NaCl 3M

Citrate de sodium ..... 0.3 M

Ajuster à pH 7

20X SSPE

NaCl ..... 3.6 M

NaPO4 pH 7.7 ..... 0.2 M

EDTA ..... 20 mM

1X Solution de Deinhardt

Ficoll 0.02%

Polyvinylpyrrolidone 0.02%

Albumine sérique bovine 0.02%

Tampon MOPS

Acide morpholino-propane-sulfonique, pH 2 ..... 40 mM

Acétate de sodium ..... 10 mM

EDTA ..... 1 mM

1X Tampon TAE

Tris-Acétate ..... 40 mM

EDTA ..... 1 mM

Ajuster à pH 8 avec l'acide acétique glacial.

1X Tampon TBE

Tris base ..... 45 mM

Acide Borique ..... 45 mM

EDTA ..... 2 mM

Ajuster à pH 8 avec l'acide acétique glacial.

9. CONCLUSION

Nous avons décrit dans ce chapitre les principales techniques et protocoles pouvant être utilisés pour l'hybridation moléculaire. Il faut cependant mentionner que chaque application peut nécessiter des ajustements afin de réduire le bruit de fond et/ou d'améliorer le seuil de détection de l'acide nucléique cible.

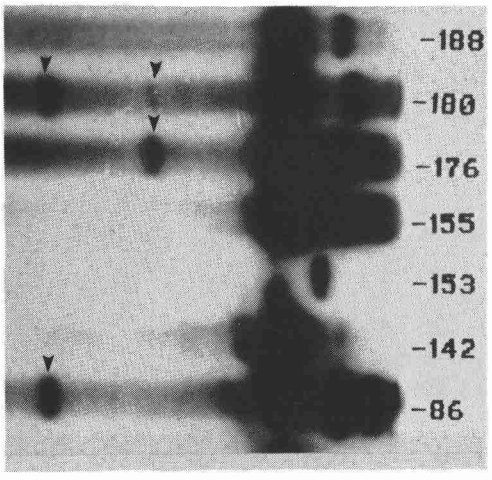


Figure 1

Hybridation de type "Southern": plusieurs plasmides (pUC 19) contenant des inserts d'ADN complémentaire du coronavirus bovin sont digérés par l'enzyme *Eco*R 1 , séparés sur gel d'agarose et transférés sur nitrocellulose. Les clones 180, 176 et 86 contiennent des fragments homologues à la sonde utilisée (indiqués par les flèches).

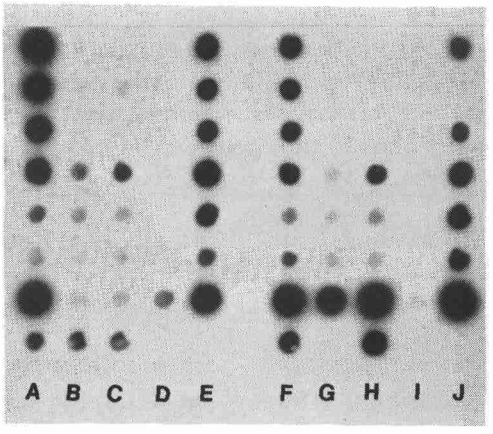


Figure 2

Hybridation d'échantillons cliniques du coronavirus bovin. Des échantillons sont déposés directement sur nitrocellulose (dot-blot) et hybridés avec une sonde d'ADN complémentaire pour démontrer la présence du virus.

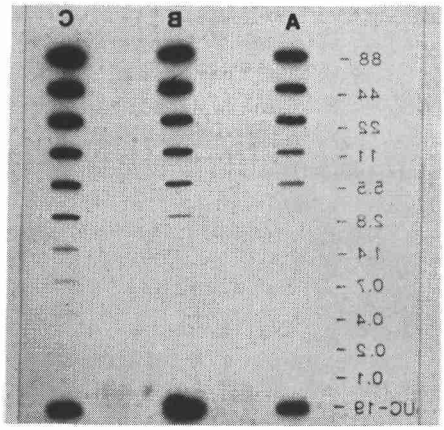


Figure 3

Hybridation entre des dilutions de coronavirus bovin et des sondes. Des dilutions de coronavirus purifiés (entre 0.1 à 88 ug de protéines virales sont déposées sur le filtre de nitrocellulose (slot-blot) et hybridées avec trois types de sondes d'ADN complémentaire (A, B, C). La sonde C permet une plus grande sensibilité de détection de la présence du virus. Le vecteur (pUC 19) contenant les différentes sondes est utilisé comme contrôle positif de l'hybridation.

10. RÉFÉRENCES

Amasino, R.M. 1986. Acceleration of nucleic acid hybridization rate by polyethylene glycol. Anal. Biochem. 152: 304-307

Bailey, J.M. and Davidson, N. 1976. Methyl mercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. Anal. Biochem. 70: 75-85.

Benton, W.D. and Davis, R.W. 1977. Screening gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-182.

Bittner, M., Kupferer, P., and Morris, C.F. 1980. Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slabs gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets. Anal. Biochem. 102: 459-471.

Cami, B., and Kourilsky, P. 1978. Screening of cloned recombinant DNA in bacteria by in situ colony hybridization. Nucleic Acids Res. 5: 2381-2390.

Carmichael, G.G., and McMaster, G.K. 1980. The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. Methods in Enzymology 65: 380-391.

Chomczynski, P., and Qasba, P.K. 1984. Alkaline transfer of DNA to plastic membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 122: 340-344.

Collins, M.L., and Hunsaker, W.R. 1985. Improved hybridization assays employing tailed oligonucleotide probes: a direct comparison with 5'-end labeled oligonucleotide probes and nick translated plasmid probes. Anal. Biochem. 151: 211-224.

Denhardt, D.T. 1966. A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm. 23: 641-646.

Gergen, J.P., Stern, R.H., and Wensink, P.C. 1979. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. Nucleic Acids Res. 7: 2115-2136

Grunstein, M., and Hogness, D.S. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 3961-3965.

Hames, B.D., and Higgins, S.J. 1987. *Nucleic Acid Hybridization: a practical approach.* IRL Press, Washington, D.C., 245 pages.

Jeffreys, A.J., and Flavell, R.A. 1977. A physical map of the DNA regions flanking the rabbit B-globin gene. Cell 12: 429-439.

Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M., and Boetker, H. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 4743-4751.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 545 pages.

Renart, J., Reiser, J., and Stark, G.R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76: 3116-3120.

Singh, L., and Jones, K.W. 1984. The use of heparin as a simple cost-effective means of controlling background in nucleic acid hybridization procedures. Nucleic Acids Res. 12: 5627-5638.

Smith, M.R., Devine, C.S., Cohn, S.M., and Lieberman, M.W. 1984. Quantitative electrophoretic transfer of DNA from polyacrylamide or agarose gels to nitrocellulose. Anal. Biochem. 137: 120-124.

Southern, E. 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-512.

Southern, E. 1979. Gel Electrophoresis of restriction fragments. Meth. Enzym. 64: 152-176.

Stellwag, E.J., Dahlberg, A.E. 1980. Electrophoretic transfer of DNA, RNA and protein onto DBM-paper. Nucleic Acids Res. 8: 299-317.

Thomas, P.S. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 5201-5205

Universités francophones est la collection de l'Université des réseaux d'expression française (UREF). Cette dernière, qui fonctionne au sein de l'AUPELF comme une Université sans murs, a été choisie par le Sommet des Chefs d'État et de gouvernement des pays ayant en commun l'usage du français comme l'opérateur privilégié du Sommet en matière d'enseignement supérieur et de recherche.

Cette collection de manuels universitaires et d'ouvrages de référence s'adresse à tous les étudiants francophones. Elle est appelée à constituer une bibliothèque universitaire en langue française dont les ouvrages sont proposés à des prix modérés.

ISBN 2-7605-0509-X

Prix : 28 $ Can

Diffusion: PUQ, ELLIPSES ou EDICEF selon les pays

59.4193.5