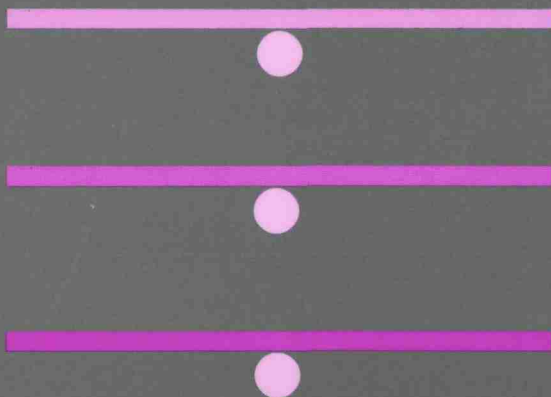
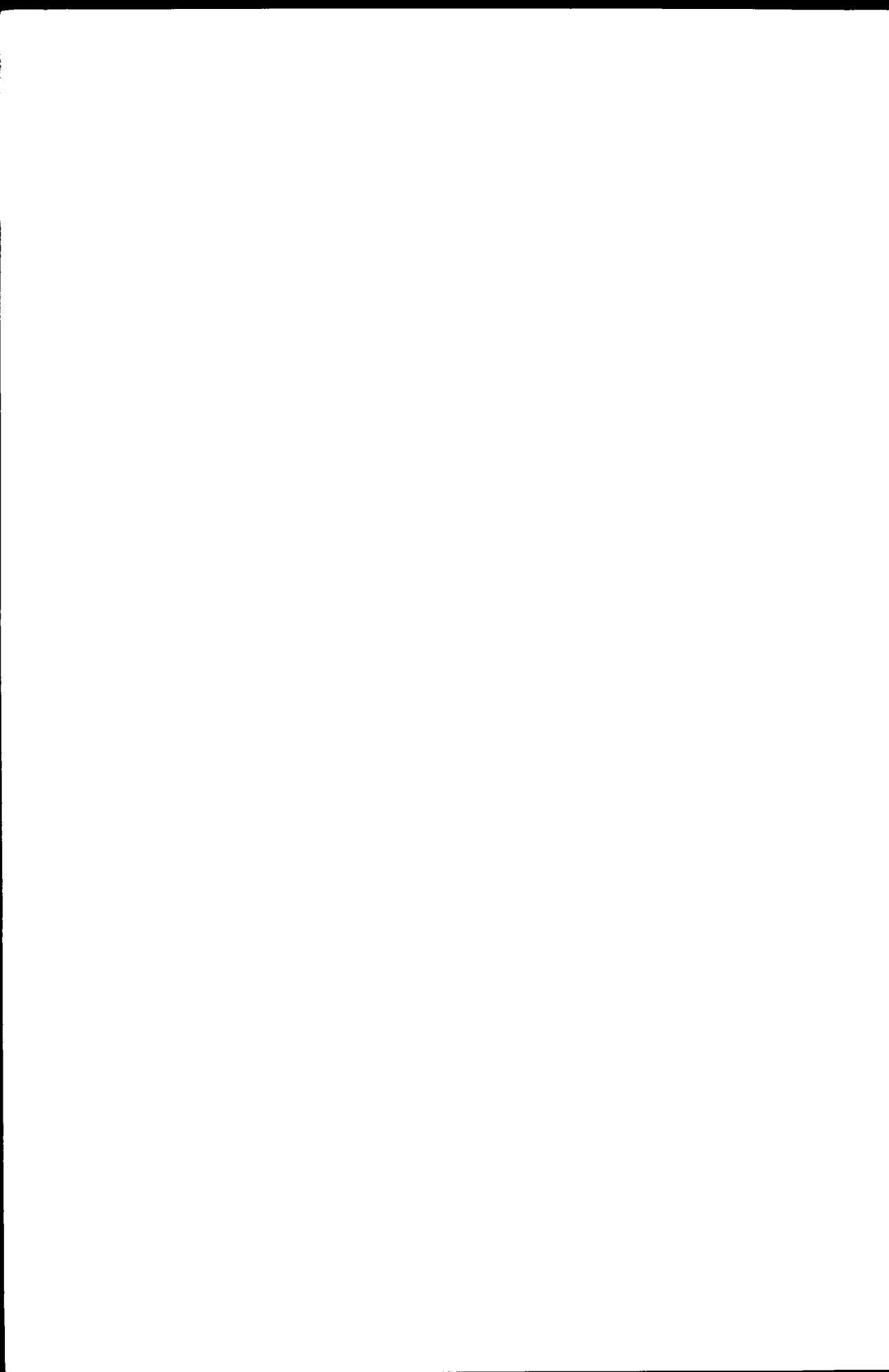




MANUEL  
DE  
TECHNIQUES  
VIROLOGIQUES

Pierre Payment / Michel Trudel









**MANUEL  
DE  
TECHNIQUES  
VIROLOGIQUES**



UNIVERSITÉS FRANCOPHONES



U R E F

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 1<sup>er</sup> 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 Jouvène  
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 Jovenne, 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

<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>vii</b>		
<b>1. SÉCURITÉ AU LABORATOIRE</b> <i>P. Payment et M. Trudel</i>			
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		
<b>2. CULTURE DE CELLULES EN FEUILLETS</b> <i>P. Payment et M. Trudel</i>			
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
		<b>3. ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES VIRUS</b> <i>P. Payment et M. Trudel</i>	
		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	2.1.	Souris .....	45
3.1.	Choix .....	25	2.2.	Rat .....	46
3.2.	Isolement .....	25	2.3.	Cobaye .....	47
3.2.1.	Macrotechnique .....	25	2.4.	Hamster .....	47
3.2.2.	Microtechnique .....	26	3.	FACTEURS INFLUENÇANT LE CHOIX ET L'UTILISATION .....	47
4.	IDENTIFICATION DES VIRUS .....	27	3.1.	Facteurs reliés à l'hôte .....	47
4.1.	Hémagglutination .....	27	3.1.1.	Génotype .....	47
4.1.1.	Tampons .....	27	3.1.2.	Âge .....	48
4.1.2.	Préparation des hématies .....	28	3.1.3.	Sexe .....	48
4.1.3.	Caractéristiques des hémagglutinines de quelques virus .....	28	3.1.4.	Statut microbiologique .....	48
4.1.4.	Titrage d'un virus hémagglutinant .....	29	3.1.5.	Environnement physique .....	50
4.2.	Hémadsorption .....	30	3.2.	Facteurs reliés à l'agent .....	50
4.2.1.	Mise en évidence .....	30	3.2.1.	Virulence .....	50
4.2.2.	Inhibition de l'hémadsorption .....	31	3.2.2.	Dose .....	51
4.3.	Effets cytopathiques .....	31	3.2.3.	Voie d'inoculation .....	51
4.3.1.	Titrage de virus par effet cytopathique .....	35	3.2.3.1.	Voie intracérébrale .....	51
4.3.2.	Détermination du titre infectieux .....	35	3.2.3.2.	Voies périphériques .....	51
4.3.2.1.	Méthode de Reed-Muench .....	35	3.2.3.2.1.	Voie respiratoire .....	51
4.3.2.2.	Méthode de Kärber .....	36	3.2.3.2.2.	Voie orale .....	52
4.4.	Titrage par plages .....	36	3.2.3.2.3.	Voie intraveineuse .....	52
4.4.1.	Entérovirus .....	36	3.2.3.2.4.	Voie intrapéritonéale .....	52
4.4.2.	Autres virus .....	38	3.2.3.2.5.	Voies sous-cutanée et intradermique .....	52
4.5.	Titrage par interférence .....	38	3.2.3.2.6.	Voie intra-utérine .....	53
4.6.	Épreuve de neutralisation de l'infectivité .....	39	4.	SIGNES VISIBLES .....	53
4.7.	Préparation de mélanges d'antisérums .....	40	4.1.	Symptômes cliniques .....	53
4.8.	Sensibilité à l'éther .....	42	4.2.	Lésions .....	54
4.9.	Sensibilité au 5-IUDR .....	42	4.3.	Épreuves sérologiques .....	54
4.10.	Microscopie électronique .....	43	4.4.	Isolement viral .....	54
4.11.	Épreuve de température .....	43	5.	RÉFÉRENCES .....	54
4.12.	Inoculation aux souriceaux nouveau-nés .....	43	5.	TECHNIQUE D'INJECTION DES ANIMAUX	
5.	RÉFÉRENCE .....	44		<i>P.J. Talbot</i>	
4.	CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MODÈLES ANIMAUX		1.	INTRODUCTION .....	57
	<i>G. Lussier</i>		2.	MATÉRIEL .....	57
1.	INTRODUCTION .....	45	2.1.	Seringues .....	57
2.	PRINCIPALES ESPÈCES .....	45	2.2.	Aiguilles .....	57
			3.	MÉTHODES .....	58
			3.1.	Injection intrapéritonéale .....	58
			3.2.	Injection intraveineuse .....	58
			3.3.	Injection intracérébrale .....	59

<b>6. CONCENTRATION DES VIRUS</b> <i>P. Payment et M. Trudel</i>	3.5. Récolte des fractions .....80
1. INTRODUCTION .....61	<b>4. PARAMÈTRES IMPORTANTS</b> .....81
2. MÉTHODES.....61	4.1. Coefficient de sédimentation ( $S_{20,w}$ ) .....81
2.1. Hydroextraction.....61	4.2. Densité de flottaison .....81
2.2. Précipitation .....62	4.3. Facteurs K et K' .....81
2.2.1. Précipitation au polyéthylène glycol .....62	4.4. Quelques considérations sur l'échantillon .....81
2.2.2. Précipitation au sulfate d'ammonium .....63	<b>5. RÉFÉRENCES</b> .....88
2.3. Filtration moléculaire .....63	<b>9. CHROMATOGRAPHIE POUR L'ISOLEMENT DES VIRUS ET DES PROTÉINES VIRALES</b> <i>M. Houde</i>
2.3.1. Cellules sous agitation .....63	1. INTRODUCTION .....89
2.3.2. En canal et tangentielle.....63	2. FILTRATION SUR GEL.....89
2.3.3. Fibres creuses .....64	3. CHROMATOGRAPHIE SUR ÉCHANGEUR D'IONS .....90
3. APPLICATIONS .....64	4. CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ .....90
4. RÉFÉRENCES .....66	5. PROTOCOLE.....91
<b>7. QUANTIFICATION DES PROTÉINES</b> <i>P.J. Talbot</i>	5.1. Stratégie .....91
1. INTRODUCTION .....67	5.2. Préparation de l'inhibiteur .....91
2. TECHNIQUE SPECTRO- PHOTOMÉTRIQUE .....67	5.3. Préparation de l'adsorbant .....91
3. TECHNIQUES COLORIMÉTRIQUES .....68	5.4. Solubilisation des glycoprotéines .....93
3.1. Test de Lowry .....68	5.5. Chromatographie .....93
3.2. Test de liaison du colorant .....70	5.6. Analyse des fractions .....94
3. RÉFÉRENCES .....72	5.7. Technique d'isolement de l'hémagglutinine .....94
<b>8. PURIFICATION ET ANALYSE DES VIRUS PAR ULTRACENTRIFUGATION</b> <i>M. Trudel et P. Payment</i>	<b>6. RÉSULTATS</b> .....94
1. INTRODUCTION .....73	6.1. Isolement de la neuraminidase .....94
2. CENTRIFUGATION DIFFÉRENTIELLE .....73	6.2. Isolement de l'hémagglutinine 94
3. CENTRIFUGATION EN GRADIENT DE DENSITÉ .....74	<b>7. CONCLUSIONS</b> .....94
3.1. Milieux de centrifugation .....74	<b>8. RÉFÉRENCES</b> .....99
3.2. Types de gradients .....76	<b>10. ÉLECTROPHORÈSE DE PROTÉINES VIRALES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE</b> <i>M. Trudel et P. Payment</i>
3.3. Types de rotors .....77	1. INTRODUCTION .....101
3.4. Tubes et récolte des fractions de gradients .....78	2. MÉTHODE.....101
3.4.1. Tubes Ultra-Clear™ .....78	2.1. Préparation des gels .....101
3.4.2. Tubes en polyallomère .....78	2.2. Préparation des échantillons .....103
3.4.3. Tubes en polycarbonate .....80	2.3. Électrophorèse .....103

2.4. Coloration au bleu de Coomassie .....	104	1.2. Pipettes calibrées .....	121
2.5. Coloration à l'argent .....	104	1.3. Microdiluteurs .....	121
3. DISCUSSION .....	105	1.4. Vérification des micro-pipettes .....	121
4. RÉFÉRENCES .....	106	1.5. Supports à plateaux .....	122
<b>11. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE</b>		2. INHIBITION DE L'HÉMADSORPTION .....	122
<i>R. Alain, L. Berthiaume et M. Trudel</i>		3. HÉMAGGLUTINATION .....	122
1. PRÉPARATION ET FIXATION DU SPÉCIMEN .....	107	3.1. Préparation d'antigènes hémagglutinants .....	122
1.1. Suspensions cellulaires et cultures de tissus .....	108	3.1.2. Liquides d'oeufs embryonnés .....	122
1.2. Tissus humains ou animaux .....	108	3.1.3. Cerveaux de souris .....	123
1.3. Fixation .....	108	3.1.4. Cultures cellulaires .....	123
1.3.1. Tétroxyde d'osmium ( $OsO_4$ ) .....	108	3.1.4.1. Congélation - décongélation .....	123
1.3.2. Permanganate de potassium .....	109	3.1.4.2. Concentration des surnageants .....	123
1.3.3. Fixateurs aldéhydiques .....	109	3.1.4.2.1. Précipitation au sulfate d'ammonium .....	123
1.4. Déshydratation .....	109	3.1.4.2.2. Précipitation au polyéthylène glycol (PEG-6000) .....	124
2. MILIEUX D'ENROBAGE .....	110	3.2. Traitements pour démasquer les hémagglutinines .....	124
2.1. Enrobage .....	110	3.2.1. Extraction alcaline .....	124
2.1.1. Résines d'époxy .....	110	3.2.2. Traitement au Tween 80-Éther .....	124
2.1.2. Vestopal W .....	110	3.3. Titrage des hémagglutinines .....	124
2.1.3. Milieux d'enrobage solubles dans l'eau .....	110	4. INHIBITION DE L'HÉMAGGLUTINATION .....	125
2.1.4. Méthacrylates .....	111	4.1. Traitement des sérums .....	125
2.2. Exemple d'enrobage: le Vestopal W .....	111	4.1.1. Kaolin acide .....	125
3. COUPES ULTRA-MINCES .....	111	4.1.2. Héparine-chlorure de manganèse .....	125
3.1. Cryotomie .....	111	4.1.3. Trypsine .....	125
3.2. Coloration des coupes .....	112	4.1.4. RDE (Receptor Destroying Enzyme) .....	125
3.2.1. Citrate de plomb .....	112	4.1.5. Acétone .....	126
4. IMPRÉGNATION NÉGATIVE .....	112	4.1.6. Adsorption des agglutinines non spécifiques .....	126
4.1. Préparation directe sur grille .....	113	4.2. La réaction d'inhibition de l'hémagglutination .....	126
4.2. Congélation-décongélation .....	114	4.3. Applications de la réaction d'inhibition de l'hémagglutination .....	127
4.3. Osmolyse .....	114	4.3.1. Virus de la rubéole .....	127
4.4. Concentration sur gélose .....	115		
4.5. Virus purifié .....	116		
4.6. Micro-ultracentrifugation .....	116		
5. RÉFÉRENCES .....	119		
<b>12. SÉROLOGIE</b>			
<i>P. Payment et M. Trudel</i>			
1. MATÉRIEL POUR LES MICROTECHNIQUES .....	121		
1.1. Plateaux .....	121		



4.3.2. Autres virus ..... 129	1.1.2. Cultures de cellules en cabarets ..... 144
5. SÉRONEUTRALISATION ..... 131	1.1.3. Coupes de tissus ..... 144
5.1. Diagnostic sérologique d'une infection ..... 131	1.2. Immunoperoxydase directe ... 145
5.1.1. Épreuve de sélection ..... 132	1.3. Immunoperoxydase indirecte 145
5.1.2. Épreuve de neutralisation .. 132	2. PEROXYDASE ANTI- PEROXYDASE (PAP) ..... 146
6. SÉPARATION DES IMMUNOGLOBULINES EN GRADIENT DE DENSITÉ DE SACCHAROSE ..... 133	3. COMPLEXE AVIDINE-BIOTINE (ABC) ..... 146
6.1. Formation manuelle de gradients ..... 134	4. RÉFÉRENCES ..... 148
6.2. Formation automatique de gradients ..... 135	<b>15. ELISA</b> <i>P.J. Talbot</i>
6.3. Interprétation des résultats ... 135	1. INTRODUCTION ..... 149
7. RÉFÉRENCE ..... 135	2. MESURE DES ANTICORPS ..... 150
<b>13. IMMUNOFLUORESCENCE</b> <i>J. Lecomte</i>	2.1. Préparation des antigènes viraux ..... 150
1. INTRODUCTION ..... 137	2.2. Méthode indirecte ..... 150
2. PRÉPARATION DU MATÉRIEL 138	2.3. Méthode indirecte en sandwich ..... 152
2.1. Préparation et infection de cellules pour virus à croissance rapide ..... 138	2.4. Expression des titres ELISA .. 152
2.2. Préparation et infection de cellules pour un virus à croissance lente ..... 139	3. RÉFÉRENCES ..... 153
2.3. Préparation de tissus ..... 139	<b>16. IDENTIFICATION DES SITES     ANTIGÉNIQUES À L'AIDE     D'ANTICORPS MONOCLONAUX</b> <i>P.J. Talbot</i>
2.3.1. Cryotomie ..... 139	1. INTRODUCTION ..... 155
2.3.2. Enrobage à la paraffine ..... 140	2. TEST DE COMPÉTITION ..... 155
2.4. Fixation des cellules ou tissus 140	2.1. Couplage de la peroxydase à l'anticorps ..... 156
3. MÉTHODE ..... 140	2.2. Couplage de la biotine à l'anticorps ..... 157
3.1. Immunofluorescence directe . 140	2.3. Test de compétition ..... 157
3.2. Immunofluorescence indirecte ..... 140	3. SÉLECTION DE VARIANTS ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX ..... 158
3.3. Élimination de la fluorescence non spécifique ..... 141	4. RÉFÉRENCES ..... 160
4. MICROSCOPIE ..... 141	<b>17. HISTOLOGIE ET     HISTOCHIMIE</b> <i>G. Lussier</i>
5. RÉFÉRENCES ..... 142	1. INTRODUCTION ..... 163
<b>14. IMMUNOPEROXYDASE</b> <i>S. Belloncik</i>	2. FIXATION DES TISSUS ..... 164
1. APPLICATION À LA MICRO- SCOPIE PHOTONIQUE ..... 144	2.1. Généralités ..... 164
1.1. Fixation ..... 144	
1.1.1. Frottis et feuillet cellulaires ..... 144	

2.2.	Formaldéhyde ou formol .....	164	7.1.	Coloration à l'hématoxyline- éosine .....	176
2.3.	Mélange de Bouin .....	164	7.2.	Coloration au May- Gruenwald-Giemsa .....	176
2.4.	Carnoy .....	164	8.	CYTOLOGIE EXFOLIATRICE .....	177
2.5.	Susa de Heidenhain .....	165	8.1.	Prélèvement des spécimens ...	177
2.6.	Fixateurs commerciaux .....	165	8.2.	Préparation des frottis .....	177
3.	IMPRÉGNATION .....	165	8.3.	La fixation .....	177
3.1.	La déshydratation .....	165	8.4.	Coloration des frottis cytol- ogiques .....	178
3.2.	Éclaircissement .....	165	8.4.1.	Méthode de Papanico- laou .....	178
3.3.	Imprégnation .....	165	9.	MONTAGE .....	179
4.	ENROBAGE .....	166	10.	RÉFÉRENCES .....	179
5.	CRYOTOMIE .....	166	<b>18. L'OR COLLOÏDAL COMME MARQUEUR EN VIROLOGIE</b>		
6.	COLORATION DES COUPES .....	166	<i>S. Garzon</i>		
6.1.	Étapes préparatoires .....	166	1.	PRÉPARATION DE SUSPENSIONS D'OR COLLOÏDAL MONODISPERSÉ ..	182
6.2.	Coloration proprement dite ..	166	1.1.	Méthode au thiocyanate de sodium ou de potassium (NaSCN ou KSCN) .....	183
6.3.	Coloration de routine à l'hématoxyline-éosine .....	166	1.2.	Méthode au sodium borohydrure .....	183
6.4.	Mise en évidence des glucides (méthode à l'acide periodique-Schiff) .....	167	1.3.	Réduction par le phosphore ..	183
6.5.	Mise en évidence des lipides (méthode à l'huile rouge O) ..	170	1.3.1.	Particules de 3 nm .....	183
6.6.	Mise en évidence des acides nucléiques .....	171	1.3.2.	Particules de 5 nm .....	184
6.6.1.	Méthode de Feulgen et Rossbeck .....	171	1.4.	Méthode aux ultrasons .....	184
6.6.2.	Méthode à l'acridine orange .....	172	1.5.	Réduction par l'acide ascorbique .....	184
6.7.	Mise en évidence des microorganismes .....	172	1.6.	Méthode à l'acide tannique ...	184
6.7.1.	Mise en évidence des bactéries par la méthode de Gram selon Brown et Brenn .....	172	1.7.	Réduction par le citrate de sodium .....	185
6.7.2.	Mise en évidence des mycobactéries par la méthode de Ziehl- Neelsen .....	173	1.7.1.	Particules d'or de 15 nm ...	185
6.7.3.	Mise en évidence des champignons par la méthode de Grocott .....	174	1.7.2.	Particules d'or de 40 nm ...	185
6.7.4.	Mise en évidence des inclusions virales par la méthode à la phloxine-tartrazine de Lendrum .....	175	1.7.3.	Particules d'or de 8 nm ...	185
7.	COLORATION DE CELLULES SUR LAMES ET LAMELLES .....	176	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	3.3.1.2. Exemple: Immuno-marquage de cellules cultivées directement sur grille .....	200
2.2. Méthodes de couplage des macromolécules à l'or colloïdal .....	187	3.3.2. Immunomarquage des virus en suspension.....	201
2.2.1. Principe général .....	187	3.4. Localisation par la méthode de pré-enrobage .....	202
2.2.2. Immunoglobulines-Or .....	188	3.5. Localisation par la méthode de postenrobage.....	203
2.2.2.1. Préparation des immunoglobulines pour l'adsorption.....	188	3.5.1. Préparation des spécimens .....	203
2.2.2.2. Détermination de la concentration minimale stabilisante de protéine.....	188	3.5.1.1. Fixation.....	203
2.2.2.3. Préparation du complexe IgG-or .....	188	3.5.1.2. Enrobage .....	204
2.2.2.4. Anticorps monoclonaux-or.....	189	3.5.2. Méthode d'immuno-or colloïdal .....	204
2.2.3. Protéine A-or .....	189	3.5.2.1. Modèle de fixation .....	204
2.2.4. Protéine-G-or .....	190	3.5.2.2. Immunomarquage .....	205
2.2.5. Enzymes-or .....	190	3.5.2.3. Enzyme-or .....	206
2.2.6. Lectine-or .....	190	3.5.2.4. Lectine-or .....	206
2.2.7. Streptavidine-or .....	191	3.5.2.5. Streptavidine-or .....	206
3. APPLICATION À LA LOCALISATION DES PROTÉINES ET DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX.....	196	3.5.2.6. Hybridation <i>in situ</i> .....	207
3.1. Application de l'or colloïdal aux méthodes d'immuno-empreinte .....	197	3.5.2.6.1. Hybridation <i>in situ</i> en microscopie optique .....	207
3.2. Application de l'or colloïdal en microscopie optique .....	197	3.5.2.6.2. Hybridation <i>in situ</i> en microscopie électronique pour les ARN .....	209
3.2.1. Marquage des cellules avant fixation.....	198	4. CONCLUSION.....	209
3.2.2. Localisation sur coupes .....	198	5. RÉFÉRENCES.....	210
3.3. Coloration de décoration immunonégative en microscopie électronique .....	199	<b>19. RADIO-MARQUAGE MÉTABOLIQUE ET CHIMIQUE</b>	
3.3.1. Immunomarquage des virus directement sur grille .....	199	<i>A. Fafard</i>	
3.3.1.1. Exemple: Immuno-marquage du virus influenza B humain.....	200	1. INTRODUCTION .....	213
		2. ACIDES NUCLÉIQUES.....	215
		2.1. Marquage <i>in vivo</i> .....	216
		2.2. Transcription acellulaire <i>in vitro</i> .....	216
		2.3. Marquage enzymatique <i>in vitro</i> .....	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	5. LIPIDES .....	239
2.3.4. Système multiprime .....	219	6. RÉFÉRENCES .....	239
2.3.5. Synthèse de sondes d'ADN sur matrices synthétiques ..	219	<b>20. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOPRÉCIPITATION</b> <i>M. Trudel et P. Payment</i>	
2.3.6. Synthèse de sondes d'ADN avec le système M13 .....	220	1. INTRODUCTION .....	241
2.3.7. Marquages terminaux .....	221	2. MÉTHODE .....	241
2.3.7.1. T4 polynucléotide kinase .....	221	3. DISCUSSION .....	244
2.3.7.2. Terminale transférase ...	222	4. RÉFÉRENCES .....	248
2.3.7.3. Fragment de Klenow ....	223	<b>21. IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOEMPREINTE</b> <i>M. Trudel et P. Payment</i>	
2.3.7.4. ADN polymérase de T4 .....	223	1. INTRODUCTION .....	249
2.3.7.5. ARN ligase de T4 .....	224	2. MÉTHODE .....	249
2.4. Radio-marquage chimique ....	225	2.1. Transfert électrophorétique ...	250
2.4.1. Radio-iodation directe .....	225	2.2. Immunoempreinte .....	251
2.4.2. Radio-iodation indirecte ....	226	3. DISCUSSION .....	251
<b>3. PROTÉINES .....</b>	<b>227</b>	4. RÉFÉRENCES .....	255
3.1. Marquage <i>in vivo</i> .....	229	<b>22. CARTOGRAPHIE PEPTIDIQUE</b> <i>M. Trudel et P. Payment</i>	
3.2. Traduction <i>in vitro</i> .....	229	1. INTRODUCTION .....	257
3.3. Marquage enzymatique <i>in vitro</i> .....	231	2. SÉPARATION DES PROTÉINES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE .....	257
3.3.1. Lactoperoxidase .....	231	3. CLIVAGE CHIMIQUE .....	258
3.3.2. Les Enzymobeads™ (Bio-Rad) .....	232	3.1. Bromure de cyanogène (CNBr) .....	258
3.4. Radio-marquage chimique ....	232	3.2. N-chlorosuccinimide (NCS) ..	258
3.4.1. Radio-iodation directe .....	232	3.3. Clivage enzymatique .....	259
3.4.1.1. Monochlorure d'iode ....	232	4. DISCUSSION .....	259
3.4.1.2. Chloramine-T .....	233	5. RÉFÉRENCES .....	263
3.4.1.3. Iodobeads™ (Pierce) .....	233	<b>23. ÉLECTROPHORÈSE DE MOLÉCULES D'ADN EN GEL D'AGAROSE</b> <i>C. Hamelin</i>	
3.4.1.4. Iodo-Gen™ .....	234	1. ÉLECTROPHORÈSE .....	265
3.4.2. Radio-marquage indirect ...	234	1.1. Appareil à électrophorèse .....	265
3.4.2.1. Réactif de Bolton-Hunter .....	234	1.2. Gels d'agarose en plaque .....	266
3.4.2.2. Réactif de Wood .....	235	1.3. Discussion .....	266
3.4.2.3. Acide diiodosulfanilique diazoté .....	236		
3.4.2.4. Acide N-hydroxy- succinimidyl-4-azido- salicylique (ANHS-AS) ..	236		
3.4.3. Marquage au tritium .....	237		
3.4.4. Marquage avec les radionucléides métalliques .....	237		
<b>4. POLYSACCHARIDES .....</b>	<b>238</b>		

2. GÉNOTYPAGE .....	272	26. CLONAGE DES GÈNES DE VIRUS À ADN	
2.1. Infection des cellules .....	272	<i>C. Simard</i>	
2.2. Préparation de l'ADN .....	272	1. INTRODUCTION .....	295
2.3. Clivage et électrophorèse .....	273	1.1. Fragmentation de l'ADN à cloner .....	295
2.4. Résultats .....	273	1.1.1. Méthode des digestions totales .....	295
3. DISCUSSION .....	273	1.1.2. Méthode des digestions partielles .....	296
4. RÉFÉRENCES .....	278	1.2. Choix du vecteur de clonage .....	296
<b>24. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX</b>		1.2.1. Les vecteurs lambda et les cosmides .....	296
<i>P. Jouvienne et F. Fossiez</i>		1.2.2. Les vecteurs plasmidiques .....	297
1. INTRODUCTION .....	279	2. MÉTHODE .....	297
2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX .....	279	2.1. Isolement de l'ADN viral .....	298
2.1. Extraction des génomes à partir de virus purifiés .....	279	2.1.1. Concentration des virions .....	298
2.2. Extraction des ARNm viraux .....	281	2.1.2. Purification de l'ADN viral .....	298
2.2.1. Extraction des ARN cellulaires et viraux .....	282	2.2. Digestion partielle de l'ADN génomique .....	299
2.2.2. Sélection des ARN poly(A)+ sur colonne de cellulose- oligo(dT) .....	282	2.3. Linéarisation du vecteur .....	301
2.2.3. Discussion .....	283	2.4. Remplissage partiel des bouts cohésifs .....	301
2.3. Extraction des plasmides recombinants par lyse alcaline .....	283	2.5. Ligatures .....	302
2.3.1. Extraction plasmidique à partir d'un petit volume de culture .....	284	2.5.1. Ligatures témoins .....	302
2.3.2. Extraction plasmidique à partir d'un grand volume de culture: amplification des plasmides .....	285	2.5.2. Ligature de l'ADN viral avec le vecteur .....	303
2.3.3. Discussion .....	286	2.6. Transformation de <i>E. coli</i> .....	303
3. RÉFÉRENCES .....	286	2.6.1. Préparation des cellules compétentes .....	304
<b>25. TRADUCTION <i>IN VITRO</i></b>		2.6.2. Transformation proprement dite .....	304
<i>P. Jouvienne</i>		2.6.3. Étalement des cellules transformées .....	305
1. INTRODUCTION .....	289	2.6.3.1. Détermination de la viabilité cellulaire .....	305
2. SYSTÈMES DE TRADUCTION <i>IN VITRO</i> .....	289	2.6.3.2. Détermination de l'efficacité de transformation .....	305
2.1. Lysat de réticulocytes .....	289	2.6.3.3. Étalement des transformants et détermination du bruit de fond .....	305
2.2. Ovocytes d'amphibien .....	291	3. RÉFÉRENCES .....	307
3. CONCLUSION .....	292		
4. RÉFÉRENCES .....	292		

<b>27. SYNTHÈSE D'ADN COMPLÉMENTAIRE</b>	
<i>J.A. Verbeek et M. Arella</i>	
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
<b>28. SÉQUENÇAGE DES GÈNES VIRAUX</b>	
<i>F. Fossiez</i>	
1. SÉQUENÇAGE PLASMIDIQUE .....	319
2. MÉTHODE .....	320
3. RÉFÉRENCES .....	324
<b>29. ÉTALEMENT DES ACIDES NUCLÉIQUES ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE</b>	
<i>R. Alain</i>	
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 bicaténares .....	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
<b>30. HYBRIDATION MOLÉCULAIRE</b>	
<i>M. Arella et J.A. Verbeek</i>	
1. INTRODUCTION .....	337
2. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> 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	5.4. Sondes biotinylées .....	345
4.2.1. Nitrocellulose .....	342	5.4.1. Pré-hybridation .....	345
4.2.2. Nylon .....	342	5.4.2. Hybridation .....	345
4.3. Transfert et immobilisation de l'ARN .....	342	6. DÉTECTION DE L'HYBRIDA- TION ET RÉUTILISATION DES FILTRES .....	346
5. HYBRIDATION .....	343	7. DÉTECTION DE VIRUS PAR HYBRIDATION .....	346
5.1. Hybridation avec des sondes radioactives .....	343	7.1. Virus contenant un génome d'ARN ou d'ADN monocaténaire .....	346
5.1.1. Pré-hybridation .....	343	7.2. Virus contenant un ARN ou un ADN bicaténaire .....	347
5.1.2. Hybridation .....	343	8. SOLUTIONS .....	347
5.2. Hybridation avec des sondes d'oligonucléotides .....	344	9. CONCLUSION .....	347
5.2.1. Pré-hybridation .....	344	10. RÉFÉRENCES .....	349
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		

