

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 particuliers 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 $\times g$) 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 $\times g$ 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 $\times g$ 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 10⁶ 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 cm²) 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/cm² /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).

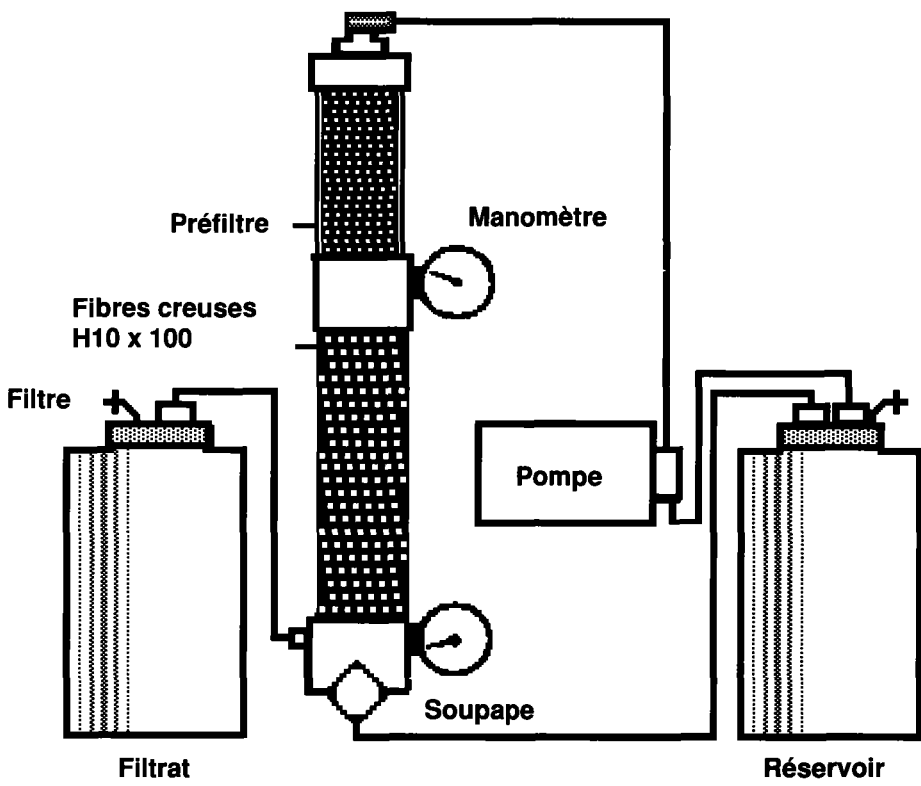
1. Filtrer le liquide à concentrer sur un filtre capable de retenir les particules de plus de 10 μm (Millipore, préfiltre AP-25 par exemple, sous forme de disque de 142 mm). La plupart des systèmes de filtration moléculaire contiennent déjà un préfiltre de 100 μm .
2. La concentration se fera d'abord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

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'exécution, 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 $E(1\%, 1 \text{ cm})$, 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.

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

ou encore:

$$A = E_{1\text{ cm}}^{1\%} \times c \times L$$

et en transmittance:

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

Dans cette formule:

- ϵ : coefficient d'extinction molaire ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$: 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:

$$C = \frac{A}{\epsilon} \quad \text{ou} \quad c = \frac{A}{E_{1\text{ cm}}^{1\%}}$$

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 μ M
HEPES	1 μ M
EDTA	50 μ M
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

<i>Solution A-1:</i>	Tartrate de sodium ou potassium 2% (p/v)
<i>Solution A-2:</i>	Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1% (p/v)
<i>Solution A-3:</i>	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:

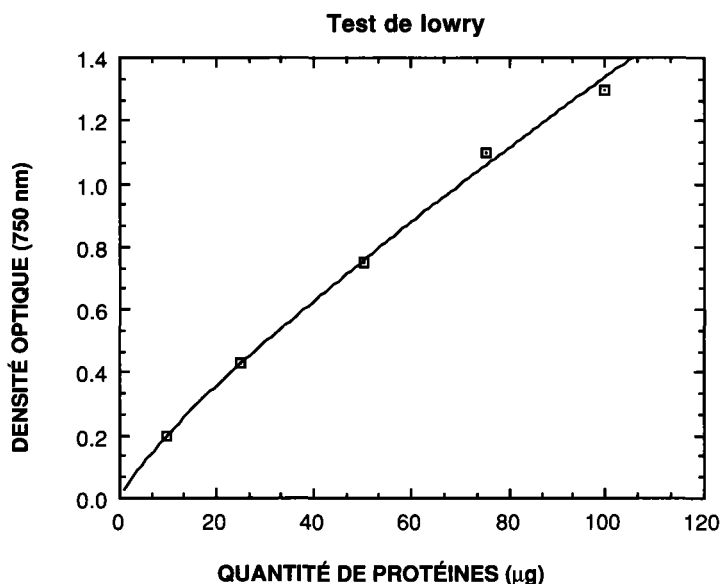
Albumine sérique bovine 1 mg/ mL
(conserver congelée à -20°C)

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 (μ L):	0	10	25	50	75	100	150	200
H_2O (μ L):	200	190	175	150	125	100	50	0
Protéine (μ g):	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'échan-

tillon 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 gardée 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)**

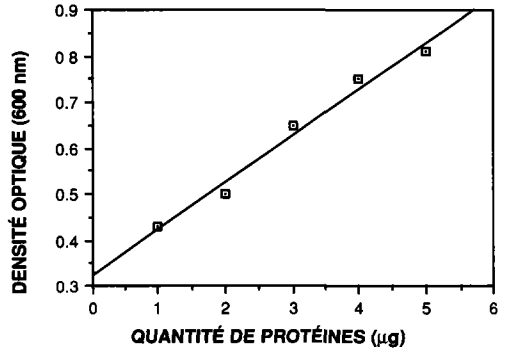
Les microcabarets à 96 puits à fond plat sont utilisés couramment pour les tests immunoenzymatiques et les résultats sont lus dans un spectrophotomètre à faisceaux verticaux (Titertek, Flow Laboratories ou l'équivalent). Il est donc pratique d'effectuer le test de quantification des protéines lorsque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

TEST DE LIAISON DU COLORANT (Microtest)



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.

PURIFICATION ET ANALYSE DES VIRUS PAR ULTRACENTRIFUGATION

Michel Trudel et Pierre Payment

1. INTRODUCTION

Les virus sont des agents infectieux de nature particulière 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 ($20\ 000 \times g$, 15 min) ou encore déposer au culot le virus en augmentant la vitesse et le temps ($100\ 000 \times g$, 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 particulière: 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 osmolarité
- 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 une 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** (Nyeyaaard 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 particulière 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, $d = 1.05 \text{ g/cm}^3$, alors que les virus nus $d = 1.1 \text{ g/cm}^3$. 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.

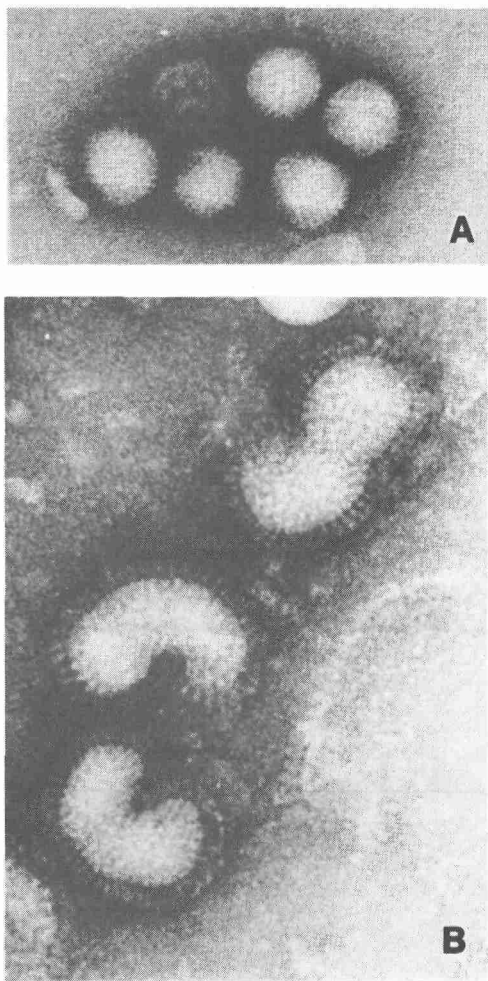


Figure 1

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 $\times g$, 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 $\times g$.

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 allantoidien 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 ultracentrifuges, 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 polyallomère

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/cm ³	Force ionique	Osmolalité à 1.2 g/cm ³	Viscosité	Absorp. UV
<i>Sels inorganiques</i>						
Chlorure de césium	168.4	1.88	++++	++++	+	faible
Trifluoroacétate de césium	245.9	2.60	++++	++++	+	faible
<i>Molécules organiques</i>						
Saccharose	342.3	1.30	non-ionique	++++	++++	faible
Ficoll	400 000	1.23	non-ionique	++++	++++	faible
Tartrate de potassium	226.3	1.48	++++	++++	+	faible
<i>Molécules aromatiques iodées</i>						
Nycodenz	821	1.42	non-ionique	iso-osmotique	++	faible
Métrizamide	789	1.46	+	iso-osmotique	++	faible
Rénographine	614	1.45	+	iso-osmotique	++	faible
<i>Silice colloïdale</i>						
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/cm³) (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, herpès-virus, 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 radio-immunologiques.

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).

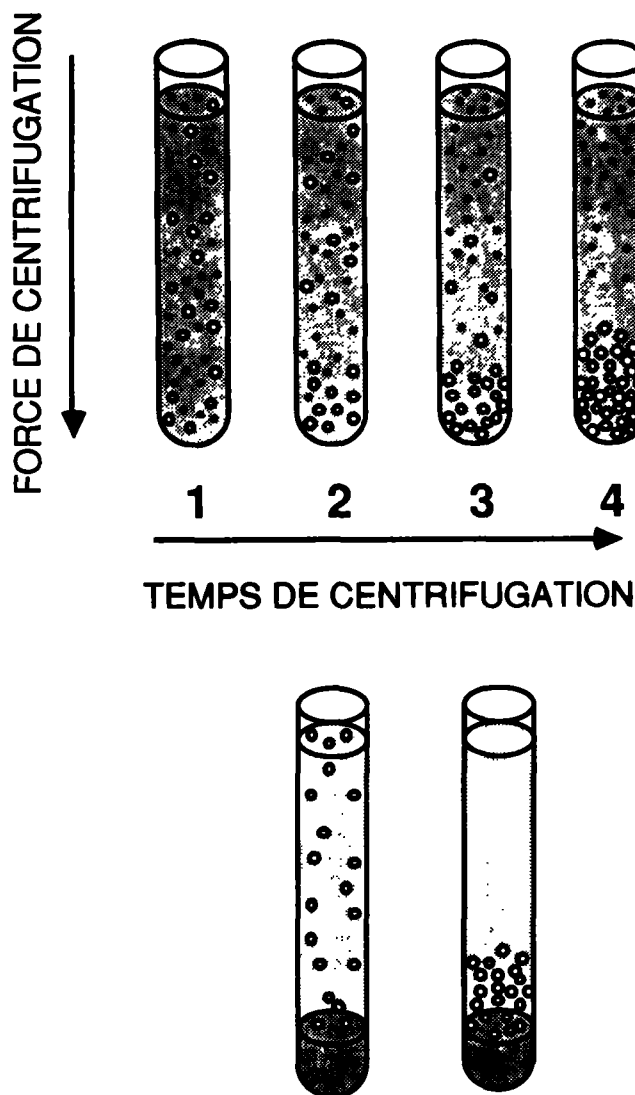
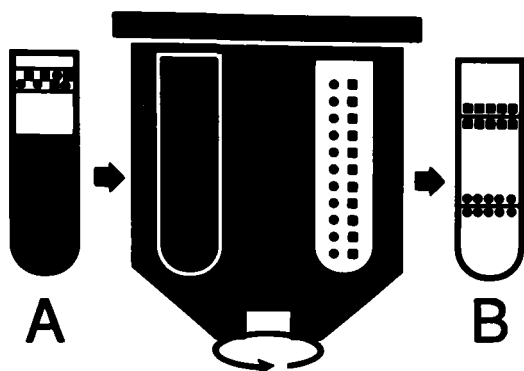


Figure 2

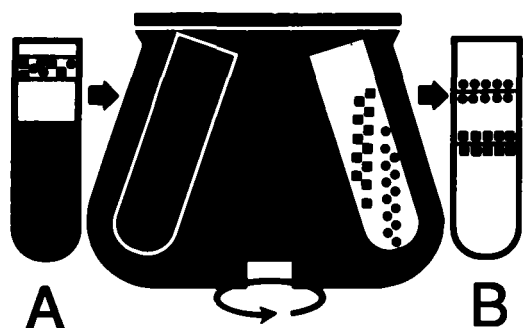
Sédimentation différentielle de particules virales

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).

A) Rotor vertical



B) Rotor à angle fixe



C) Rotor horizontal

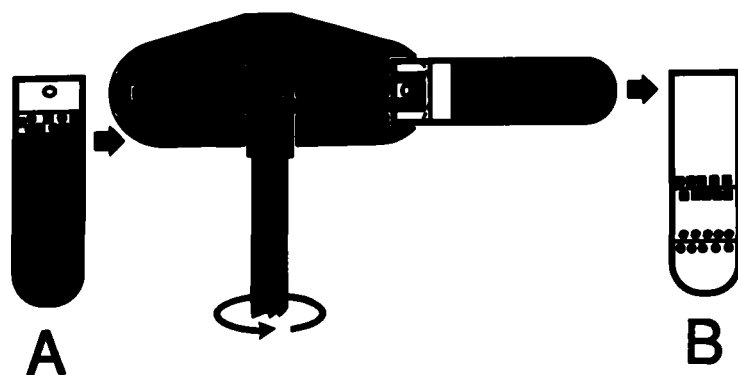


Figure 3

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'utilisé 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.

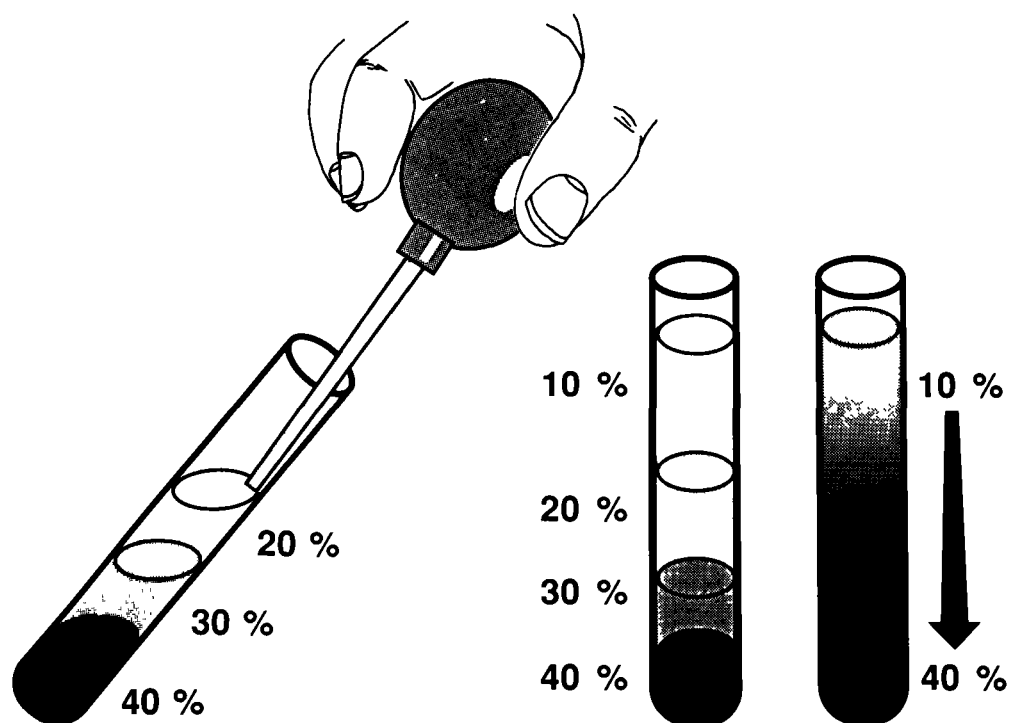


Figure 4

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.

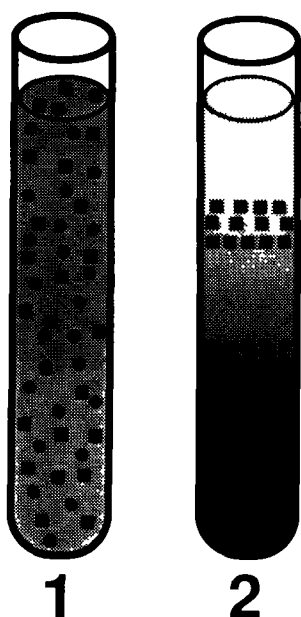


Figure 5

Représentation schématique d'un gradient généralisé 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 générer 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).

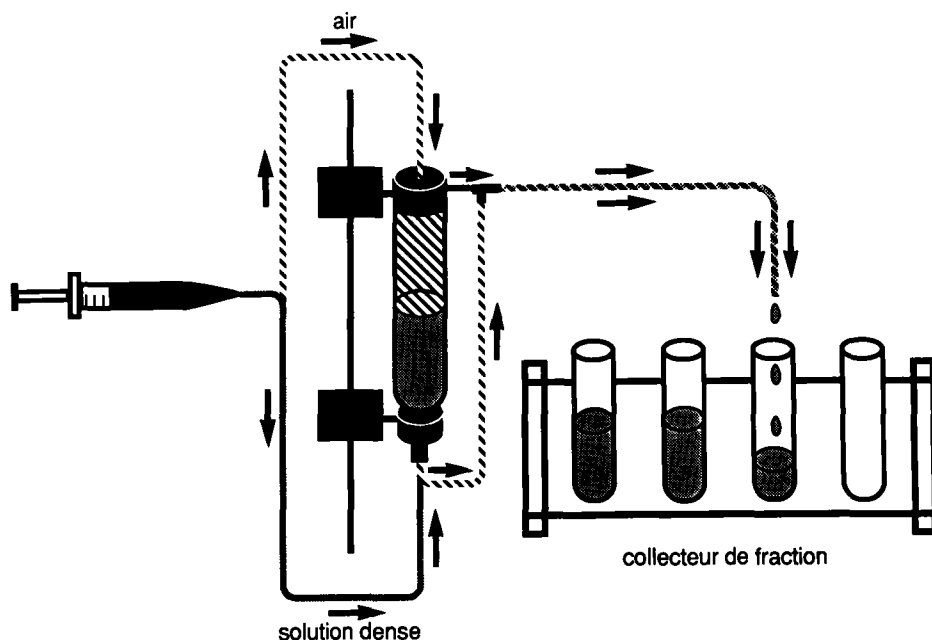


Figure 6

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. À 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 ($\times 10^6$)	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
Micoviridés	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/cm ³	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, 316 pages.
- 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 techniques 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. Cheremisinoff 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.

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 offerts 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 grippe. 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.
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.

5.4. 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'héماغglutination (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.

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'élu-tion se fait jusqu'à ce que l'absorbance (254 nm) revienne au niveau du tampon d'élu-tion. La longueur d'onde de 254 nm est préférable à 280 nm, en raison de l'in-terférence 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 ac-tivités neuraminidasique et hémagglu-tinante ainsi que leur absorbance (254 nm). Le test d'activité neuraminida-sique se fait par évaluation spectrophoto-métrique 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'élu-tion 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'absor-bance à 254 nm (celle-ci devrait revenir à 0.1–0.2). La NA peut être ensuite dialysée, concentrée ou lyophilisée. On peut effec-tuer 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 sac-charose 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 conser-vation de l'activité hémagglutinante de HA.

6. RÉSULTATS

6.1. ISOLEMENT DE LA NEURAMINIDASE

La figure 2a illustre une chromato-graphie 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'ap-paraît dans l'éluat. La NA isolée peut re-présenter 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 vi-rus) peuvent être obtenus avec cette tech-nique. Par contre l'activité hémaggluti-nante peut être difficile à conserver.

7. CONCLUSIONS

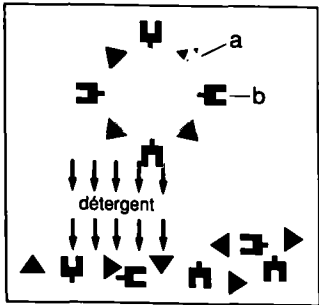
Le protocole illustré dans ces pages ne représente que l'une des nombreuses applications de la chromatographie en virologie. Les applications possibles sont nombreuses car il y a peu de facteurs limi-tants. Les particules virales peuvent être isolées de presque n'importe quel milieu, la plupart des propriétés physico-chimi-ques 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.

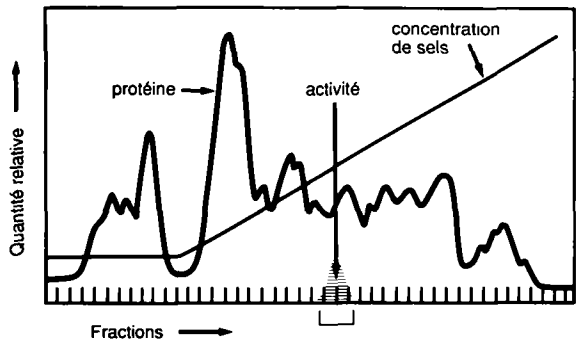
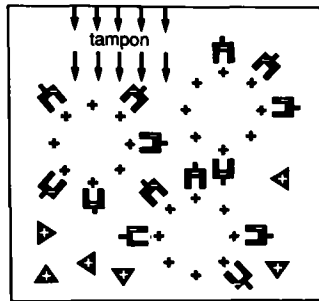
Cette technique comporte aussi certains désavantages. Ainsi, l'isolement des virus et des protéines virales reposant sur leurs propriétés spécifiques, ce fait entraîne la spécificité de chaque système chromatographique, inconvénient qui est moins fréquent en électrophorèse. La présence de contaminants 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.

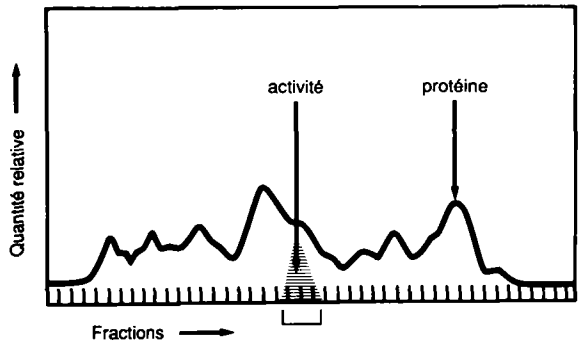
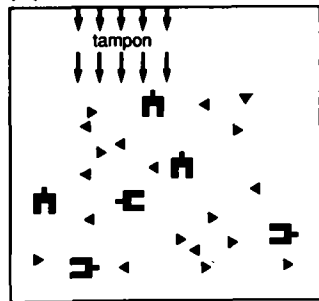
(A) VIRUS



(B) CHROMATOGRAPHIE ÉCHANGEUSE D'IONS



(C) FILTRATION SUR GEL



(D) CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITÉ

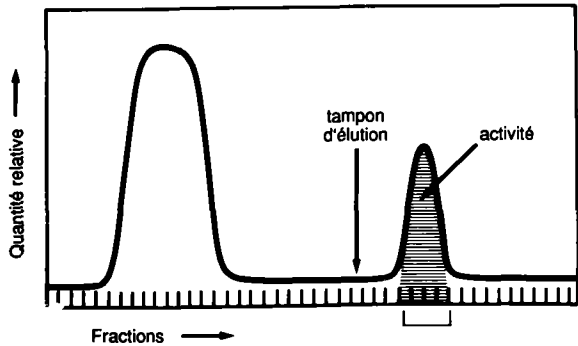
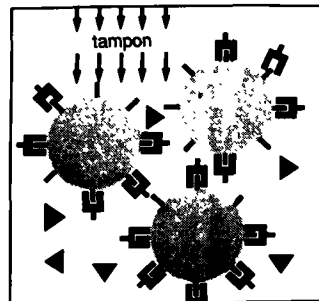


Figure 1

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.

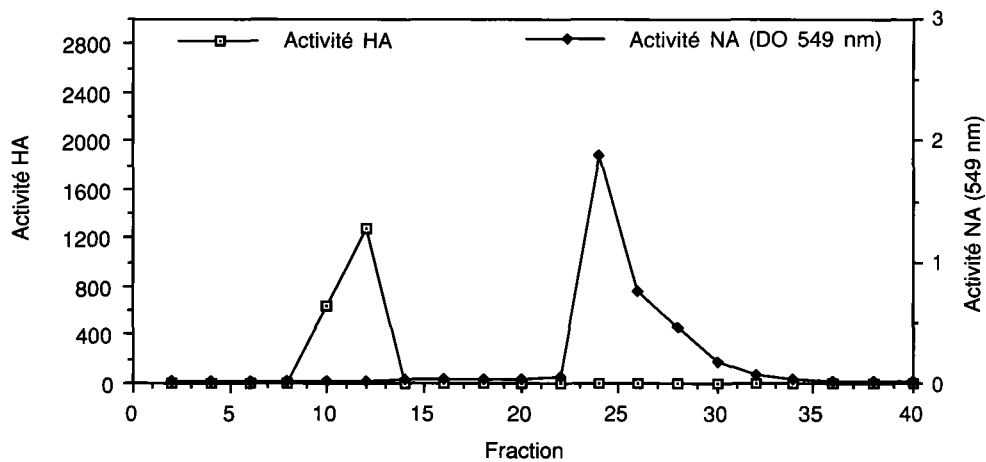


Figure 2a

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.

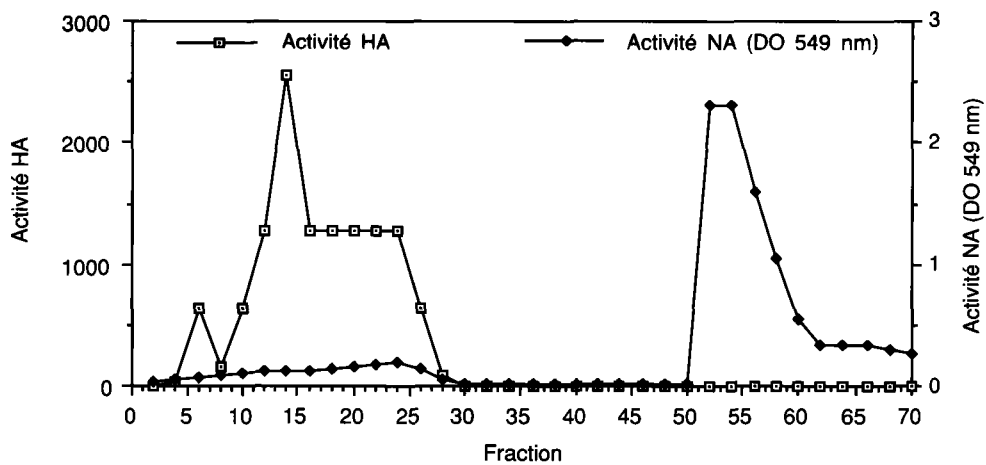


Figure 2b

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. Engineering* 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.

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 base36.6 g
- SDS0.8 g
- EDTA tétrasodique1.52 g
- TEMED230 µL

Ajouter 50 mL d'H₂O 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'H₂O et ajuster le pH à 6.8 avec HCl 10 N, puis complète à 100 mL.

Solution C

- Acrylamide30 g
- N.N'-méthylène-bis-acrylamide0.8 g

Compléter à 100 mL avec H₂O, 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

- SDS10 g

Compléter à 100 mL avec H₂O

Solution E

- Persulfate d'ammonium0.2 g

Compléter à 100 mL avec H₂O. Utiliser toujours une solution fraîche afin d'assurer une polymérisation égale du gel.

Solution F

- Bleu de bromophénol0.05 g

Complétez à 100 mL avec H₂O.

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.

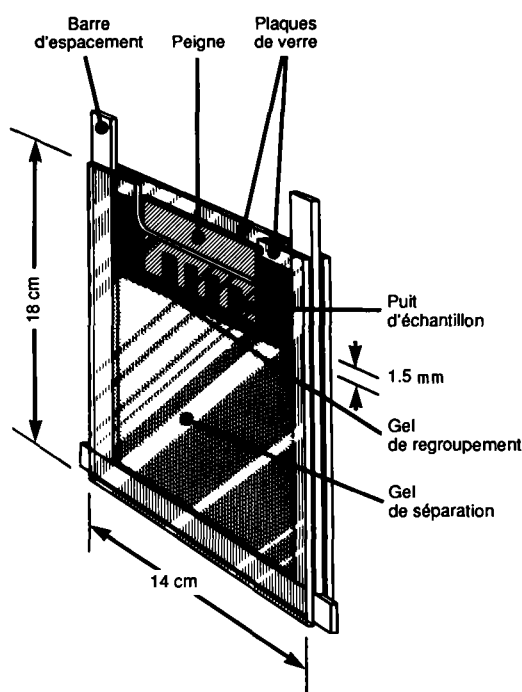


Figure 1

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.

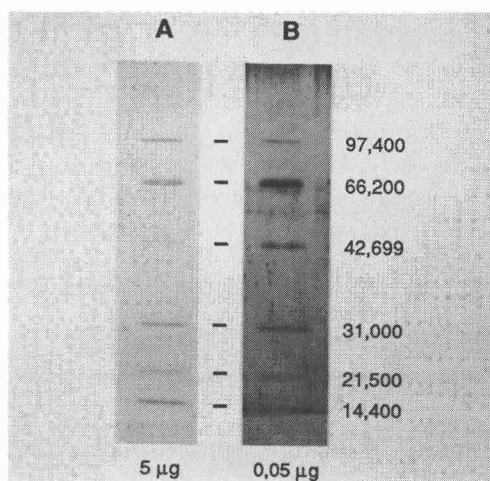


Figure 2

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 Merrill 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.