# 16

# IDENTIFICATION DES SITES ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Pierre J. Talbot

## 1. INTRODUCTION

L'utilisation d'anticorps monoclonaux, facilite grandement l'identification sur des protéines virales de sites antigéniques importants dans l'interaction du virus avec l'hôte. Gerhard *et al.* (1978) furent les pionniers de cette nouvelle approche qu'ils ont appliquée au virus de la grippe. En effet, un anticorps monoclonal reconnaît spécifiquement un assemblage séquentiel ou conformationnel de quelques acides aminés seulement, que l'on appelle épitope. Cette spécificité est très grande puisque la modification d'un seul acide aminé à l'intérieur d'un tel épitope suffit à abolir la reconnaissance par l'anticorps monoclonal. Toutefois, la taille considérable d'une immunoglobuline nécessite l'introduction de la notion de site antigénique comme étant un regroupement de plusieurs épitopes localisés si près les uns des autres qu'ils ne peuvent pas être différentiés par les tests opérationnels décrits plus loin (Lubeck et Gerhard 1981, Yewdell et Gerhard 1981).

Deux approches méthodologiques complémentaires sont utilisées pour le délinéament des sites antigéniques sur les protéines virales: des tests de compétition entre anticorps monoclonaux pour la liaison sur la protéine virale et la sélection de variants antigéniques par pression sélective d'un anticorps monoclonal.

## 2. TEST DE COMPÉTITION

Cette technique met à profit le test de radio-immunodosage ou d'ELISA en phase solide. On doit d'abord obtenir une batterie d'anticorps monoclonaux spécifiques à une seule protéine virale en immunoprécipitation (voir Chapitre 20). Chaque anticorps est alors marqué soit radioactivement ($^{125}I$), soit avec un enzyme (peroxydase de raifort) ou encore avec la biotine. La série d'anticorps est alors analysée en paires, anticorps marqué/anticorps non marqué, avec la protéine virale absorbée sur une phase solide telle que les puits d'un microcabaret de plastique. Si l'anticorps

non-marqué reconnaît un épitope physiquement identique ou rapproché de celui reconnu par l'anticorps marqué, ce dernier verra sa liaison avec la protéine virale bloquée par l'encombrement stérique occasionné par l'anticorps non-marqué. D'autre part, aucune compétition ne sera observée si les deux épitopes sont suffisamment éloignés, c'est-à-dire contenus dans deux sites antigéniques différents. Par ailleurs, l'observation d'une compétition partielle entre ces deux anticorps indique que les épitopes sont suffisamment éloignés l'un de l'autre, mais qu'ils sont toujours à l'intérieur d'un même site antigénique.

Cette technique de compétition en phase solide fut introduite par Stone et Nowinski (1980), qui signale cependant que de fausses interprétations sont possibles lorsque deux anticorps d'affinités différentes sont utilisés. En effet, un anticorps de faible affinité compétionnera difficilement avec un anticorps de haute affinité. Il est donc essentiel d'effectuer le test de compétition selon les deux combinaisons possibles anticorps marqué/anticorps non marqué et de se méfier des observations de compétition dans seulement l'une des deux combinaisons.

Le marquage des anticorps monoclonaux est crucial pour l'obtention de résultats clairs au moment de délinéament de sites antigéniques sur les protéines virales. On a d'abord utilisé le marquage radioactif et le test de radio-immunodosage. Toutefois, nous avons souvent observé l'effet négatif d'un tel traitement sur l'activité biologique de l'anticorps. Nous favorisons donc l'approche de type ELISA dans laquelle l'anticorps est conjugué, soit à l'enzyme peroxydase, soit à la biotine. Dans ce dernier cas, la liaison de l'anticorps marqué est détectée à l'aide d'avidine ou de streptavidine préalablement conjuguée à la peroxydase. Il semble d'ailleurs que de telles approches colorimétriques deviennent de plus en plus populaires.

## 2.1. COUPLAGE DE LA PEROXYDASE À L'ANTICORPS

La technique de Wilson et Nakane (1978) nous a permis d'obtenir de meilleurs résultats. Comme matériel de départ, nous utilisons des immunoglobulines (IgG) semi-purifiées par précipitation à 4°C avec un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (pH 7.4). De meilleurs résultats peuvent aussi être obtenus en purifiant les immunoglobulines par chromatographie d'affinité sur colonne de Protéine A-Sepharose (Ey *et al.* 1987, Seppälä *et al.* 1981, Manil *et al.* 1986).

1. Dialyser la préparation d'IgG contre un tampon carbonate/bicarbonate de sodium 0.01 M, pH 9.5.

2. Ajuster à 8 mg IgG (par immunodiffusion radiale dans le cas d'IgG non purifiées ou par un test de quantification des protéines pour des IgG purifiées).

3. Dissoudre 4 mg de peroxydase de raifort (Sigma Chemicals Inc, Type VI) dans 1 mL d'eau distillée.

4. Ajouter à la solution de peroxydase 0.2 mL d'une solution fraîchement préparée de periodate de sodium 0.1 M. Agiter à 25°C pendant 20 min (la solution passera de brune à verte).

5. Dialyser la solution du dérivé aldéhyde de la peroxydase contre un tampon d'acétate de sodium 1 mM, pH 4.4.

6. Amener la solution dialysée du dérivé aldéhyde de la peroxydase à pH 9.0–9.5 en ajoutant 20 µL d'un

tampon carbonate–bicarbonate de sodium 0.2 M, pH 9.5. Ajouter immédiatement les 8 mg d'IgG dans 1 mL de tampon pH 9.5 (voir étapes 1 et 2 ci-dessus). Agiter pendant 2 h à 25°C.

7. Ajouter à ce conjugué peroxydase-IgG sous forme de base de Schiff 0.1 mL d'une solution fraîchement préparée de borohydrure de sodium 4 mg/mL. Laisser incuber pendant 2 h à 4°C.

8. Ajouter un volume égal de glycérol et conserver soit à 4°C avec du merthiolate de sodium 1 mM ou préférablement à –20 ou –70°C.

## 2. 2. COUPLAGE DE LA BIOTINE À L'ANTICORPS

La technique de Guersdon *et al.* (1979), telle qu'adaptée par Kendall *et al.* (1983) et Mäkelä *et al.* (1987) est utilisée. La préparation des immunoglobulines a été décrite pour le couplage à la peroxydase (voir section 2.1).

1. Dialyser la préparation d'IgG contre un tampon PBS pH 7.4.

2. Ajuster à 1 mg/mL d'IgG.

3. Dissoudre 1 mg/mL de N-hydroxyl-succinimido-biotine dans du N'-N'-diméthylformamide à 25%.

4. Ajouter 194 µL de la solution de biotine à 1 mL de la solution d'IgG. Il s'agit d'un rapport moléculaire biotine:IgG de 90:1, si on assume que chaque molécule d'IgG contient 90 groupements aminés libres. Ce rapport semble être optimal (Kendall *et al.* 1983, Mäkelä *et al.* 1987). Toutefois, il pourrait varier selon l'anticorps monoclonal à biotinyler et il serait alors avantageux de l'optimiser en utilisant entre 50 et 400 µL de la solution de biotine par mL de solution d'IgG, et en testant par la suite la qualité de conjugué obtenu dans le test ELISA décrit ci-après.

5. Incuber à 25°C pendant 3 à 4 h.

6. Dialyser contre du tampon PBS pH 7.4 pendant environ 24 h, en effectuant trois changements de tampon.

7. Ajouter un volume égal de glycérol et conserver à –20 ou –70°C jusqu'à utilisation.

## 2. 3. TEST DE COMPÉTITION

Le protocole de Talbot *et al.* (1984, 1985) est utilisé lorsque les anticorps monoclonaux sont couplés directement à la peroxydase. Une étape supplémentaire d'addition de peroxydase couplée à la streptavidine est ajoutée lorsque des anticorps biotinylés sont utilisés. Le protocole détaillé du test immunoenzymatique est décrit au chapitre précédent. Seules les modifications seront décrites ici.

1. Préparer des plateaux contenant l'antigène viral et 8 puits d'antigène témoin par dilution d'anticorps monoclonal conjugué à tester.

2. Ajouter la solution de blocage pendant 60 min à 25°C.

3. Ajouter des dilutions d'anticorps compétiteur non-conjugué (1 ng à 5 µg d'IgG) dans un volume de 100 µL et incuber pendant 2 à 20 h à 25°C. L'antigène témoin est conservé dans la solution de blocage.

4. Jeter les solutions contenues dans les puits d'antigène viral et témoin. Laver délicatement une fois avec le tampon de lavage (optionnel).

5. Ajouter 100 µL par puits d'anticorps conjugué à la peroxydase ou à la biotine. La dilution à utiliser a été préalablement établie de façon à ce que l'absorbance finale sans compétition se situe entre 1.0 et 1.5. Les 8 puits d'antigène témoin sont aussi utilisés pour chaque dilution d'anticorps conjugué, de façon à quantifier le bruit de fond de la technique. Il est aussi essentiel de mesurer la liaison de chaque dilution de conjugué à l'antigène viral, en absence d'anticorps compétiteur. Incuber pendant 90 min à 25°C.

6. Vidanger les conjugués et laver les puits trois fois avec le tampon de lavage.

7. Dans le cas des anticorps conjugués à la peroxydase, passer à l'étape 8. Pour ce qui est des anticorps biotinylés, ajouter une dilution appropriée de streptavidine-peroxydase dans un volume de 100 µl par puits. Incuber pendant 90 min à 25°C. Vidanger et laver les puits trois fois avec le tampon de lavage.

8. Ajouter le substrat de la peroxydase pendant 30 min à 25°C et arrêter la réaction avec le HCl 1N. Lire l'absorbance à 492 nm.

Les résultats de compétition sont exprimés en fonction de l'absorbance (A) moyenne observée pour la liaison de chaque dilution de conjugué à l'antigène viral (Av) et témoin (At) en l'absence d'anticorps compétiteur (Ac):

$$\% \text{ compétition} = \frac{Av - Ac}{Av - At} \times 100$$

Ac est l'absorbance observée en présence d'un anticorps compétiteur.

En général, le niveau de compétition par l'anticorps homologue devrait être supérieure à 80%. Un niveau de compétition inférieur à 30% indique un anticorps reconnaissant un site antigénique différent. Des niveaux de compétition intermédiaires sont indicatifs d'épitopes différents mais localisés physiquement assez près l'un de l'autre pour que l'encombrement stérique des immunoglobulines induise une compétition partielle (voir Figure 1).

## 3. SÉLECTION DE VARIANTS ANTIGÉNIQUES À L'AIDE D'ANTICORPS MONOCLONAUX

Les tests de compétition entre anticorps monoclonaux décrits précédemment permettent de définir des sites antigéniques sur les protéines virales et de les corréler avec certaines activités biologiques du virus lorsque ces anticorps monoclonaux peuvent inhiber ces activités (e.g. neutralisation *in vitro*, protection passive *in vivo*, inhibition de l'activité fusogénique ou hémagglutinante, etc.). Une approche complémentaire introduite par Gerhard *et al.* (1978) consiste à utiliser des anticorps monoclonaux neutralisants pour sélectionner des virus ayant perdu par mutation spontanée les épitopes correspondants. Cette approche n'est utilisée que pour les virus à ARN, où l'absence de mécanismes de réparation lors de la réplication de l'ARN produit des erreurs de transcription à une fréquence de $10^{-4}$ à $10^{-5}$. Par conséquent, l'incubation d'une suspension virale avec un anticorps monoclonal neutralisant permettra de sélectionner ces variants antigéniques ayant perdu l'épitope reconnu par cet anticorps et donc n'étant plus neutralisés par celui-ci. Récemment, Iorio et

Bratt (1985) ont proposé une approche alternative utilisant un anticorps anti-immunoglobuline de souris qui pourrait permettre de sélectionner des variants antigéniques ayant perdu un épitope reconnu par un anticorps non neutralisant ou encore faiblement neutralisant. Le protocole suivant fait appel à un anticorps monoclonal neutralisant (Dalziel *et al.* 1986). Les variants obtenus avec une série d'anticorps sont alors étudiés quant à leur réactivité avec les anticorps disponibles de manière à établir une carte antigénique. De plus, les activités biologiques de ces variants peuvent donner des informations sur les relations structure antigénique fonction.

1. Incuber pendant 30–60 min à 37°C une préparation homogène (clonée par prélèvement de plages ou dilution limite) d'une suspension virale concentrée (plus de $10^5$ unités infectieuses) avec une dilution d'anticorps monoclonal (en général sous forme de liquide d'ascite) suffisante pour réduire de plus de 4 $\log_{10}$ le titre viral.

2. Ensemencer sur cellules permissives en présence du même anticorps monoclonal, les virus ayant survécu à la neutralisation.

3. Récolter le virus lorsque des foyers d'infection apparaissent et cloner le virus par prélèvement de plages ou dilution limite.

4. Soumettre le virus cloné à un second cycle de sélection (étapes 1, 2 et 3 ) et recloner deux fois par prélèvement de plages ou par dilution limite.

La sélection d e variants antigéniques ayant perdu leur réactivité pour un anticorps monoclonal neutralisant produit en général des mutations ponctuelles, tel que démontré récemment pour 16 variants du virus parainfluenza humain type 3 (Van Wyke Coelingh *et al.* 1987). Toutefois, il est possible que la modification d'un seul acide aminé dans un épitope entraîne une modification conformationnelle affectant un épitope complètement différent (Dalziel *et al.* 1986). Il est donc essentiel d'analyser la réactivité d'une série d'anticorps monoclonaux avec ces variants.

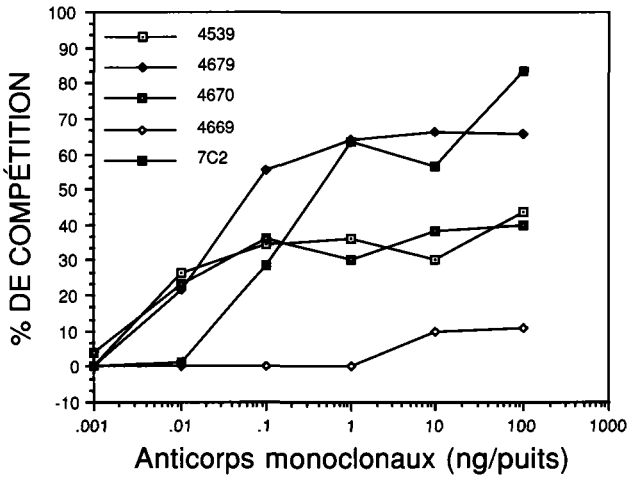


**Figure 1**

Caractérisation d'un épitope par épreuve de compétition en ELISA entre différents anticorps monoclonaux spécifiques à la protéine de fusion du virus respiratoire syncytial humain. Les AcMo 7C2 et 4679 sont identiques. Les AcMo 4670 et 4539 ont une identité à 50% alors que le 4669 semble reconnaître un site voisin mais différent.

## 4. RÉFÉRENCES

Dalziel, R.G., Lampert, P.W., Talbot, P.J. et Buchmeier, M.J. 1986. Site-specific alteration of murine hepatitis virus type 4 peplomer glycoprotein E2 results in reduced neurovirulence. J. Virol. 59: 463-471.

Ey, P.L., Prowse, S.J. et Jenkin, C.R. 1978. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein-A Sepharose. Immunochem. 15: 429-436.

Gerhard, W., Yewdell, J., Frankel, M.E. et Webster,R. 1978. Antigenic structure of influenza virus haemaglutinin defined by hybridoma antibodies. Nature (London) 290: 713-717.

Guesdon, J.-L., Ternynck, T. et Avrameas, S. 1979. The use of avidin–biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J. Histochem. Cytochem. 27: 1131-1139.

Iorio, R.M. et Bratt, M.A. 1985. Selection of unique antigenic variants of Newcastle Disease Virus with neutralizing monoclonal antibodies and anti-immunoglobulin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7106-7110.

Kendall, C., Ionescu-Matiu, I. and Dreesman, G.R. 1983. Utilization of the biotine/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Immunol. Methods 56: 329-339.

Lubeck, M.D. et Gerhard, W. 1981. Topological mapping of antigenic sites on the influenza A/PR/8/34 virus hemagglutinin using monoclonal antibodies. Virology 113: 64-72.

Mäkelä, M.J., Norrby, E. et Salmi, A. 1987. Measurement of polypeptide- and anti-genic- site specific antibodies to measles virus using a competitive enzyme immunoassay. J. Virol. Methods 16: 65-74.

Manil, L., Motté, P., Pernas, P., Troalen, F., Bohuon, C. et Bellet, D. 1986. Evaluation of protocols for purification of mouse monoclonal antibodies. J. Immunol. Methods 90: 25-37.

Seppälä, I., Sarvas, H., Péterfy, F. et Mäkelä, O.. 1981. The four subclasses of IgG can be isolated from mouse serum by using Protein A-Sepharose. Scand. J. Immunol. 14: 335-342.

Stone, M.R. et Nowinski,R.C. 1980. Topological mapping of murine leukemia virus proteins by competition binding assays with monoclonal antibodies. Virology 100: 370-381.

Talbot, P.J., Salmi,A.A., Knobler,R.L. et Buchmeier,M.J.. 1984. Topographical mapping of epitopes on the glycoproteins of murine hepatitis virus–4 (strain JHM): correlation with biological activities. Virology 132: 250-260.

Talbot, P.J., Salmi, A.A., Knobler, R.L. et Buchmeier, M.J.. 1985. Epitope-specific antibody response to murine hepatitis virus–4 (strain JHM). J. Immunol. 134: 1217-1224.

Van Wyke Coelingh, R.L., Winter, C.C., Jorgensen, E.D. et Murphy, B.R.. 1987. Antigenic and structural properties of the hemagglutinin/ neuraminidase glycoprotein of human parainfluenza virus type 3: sequence analysis of variants selected with monoclonal antibodies which inhibit infectivity, hemagglutination, and neuraminidase activity. J. Virol. 61: 1473-1477.

Wilson, M.B. et Nakane,P.K.. 1978. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxydase (HRPO) to antibodies. In *Immunofluorescence and related staining techniques*. Knapp.W., K.Holubar et G.Wick, (Édit.) Elsevier North Holland, New York pages 215-224.

Yewdell, J.W. et Gerhard,W.. 1981. Antigenic characterization of viruses by monoclonal antibodies. Ann. Rev. Microbiol. 35: 185-201.

# 17

# HISTOLOGIE ET HISTOCHIMIE

Gilles Lussier

## 1. INTRODUCTION

Les examens histologiques et histochimiques peuvent être avantageusement utilisés pour le diagnostic de certaines infections virales ou au cours de travaux expérimentaux faisant appel à l'animal de laboratoire ou à des cultures cellulaires. De tels examens permettent de mettre en évidence la morphologie que possédaient les tissus au moment de leur prélèvement. Pour ce faire, plusieurs étapes se succèdent dans la préparation des tissus avant leur coloration pour examen en microscopie photonique. La première consiste à assurer la préservation des structures tissulaires. Une fois cette préservation assurée, il est nécessaire, dans le cas des tissus prélevés chez l'organisme vivant, d'augmenter leur rigidité afin de pouvoir effectuer des coupes minces d'environ 5 µm d'épaisseur permettant le passage de la lumière du microscope. On y arrive soit par congélation, soit par imprégnation du tissu par un matériel solide. La congélation de l'eau dans le tissu entraîne son durcissement; quant à l'imprégnation, elle consiste à remplacer l'eau présente dans les tissus par une substance solide et chimiquement inactive. La paraffine est généralement employée à cette fin. Cependant, comme l'eau et la paraffine ne sont pas miscibles, il est nécessaire d'utiliser des liquides intermédiaires entre l'eau et la paraffine pour, dans un premier temps, enlever l'eau tissulaire et, dans un second temps, remplacer ce liquide par la paraffine. Ce processus, appelé circulation, s'effectue en trois étapes: la déshydratation dans laquelle l'eau est retirée du tissu, l'éclaircissement qui permet le remplacement de l'agent déshydratant par un solvant de la paraffine et finalement l'imprégnation proprement dite dans laquelle la paraffine pénètre le tissu.

Une fois imprégné de paraffine, le tissu est ensuite inclus dans un bloc avant d'être tranché à l'épaisseur désirée au moyen d'un microtome. Quant aux tissus congelés, ceux-ci peuvent être coupés sans imprégnation dans la paraffine directement au moyen d'un microtome spécial (cryotome).

Les coupes ainsi obtenues sont étalées et collées sur des lames de verre puis colorées pour la mise en évidence des éléments que l'on désire étudier. Cependant, afin d'assurer la pénétration des colorants dans les tissus, il faut en retirer

la paraffine et les réimprégner d'eau. Les coupes ainsi colorées sont protégées au moyen d'une lamelle de verre collée sur la coupe.

L'examen des cellules cultivées généralement sur lamelles en tube de Leighton ne nécessite qu'une fixation avant la coloration; dans ce cas, il n'est donc pas nécessaire de les enrober dans la paraffine.

La coloration des tissus peut être divisée en deux grands groupes: les colorations histologiques et les colorations histochimiques. Bien que le mécanisme d'action des premières ne soit pas clairement connu, il permet la mise en évidence des structures micro-anatomiques; le mécanisme d'action des secondes est plus connu et renseigne sur la chimie des tissus.

## 2. FIXATION DES TISSUS

### 2.1. GÉNÉRALITÉS

Pour assurer le maintien de la structure morphologique et de l'intégrité chimique des tissus tels qu'elles se présentaient au moment de leur prélèvement, il faut procéder à leur fixation. Cette étape critique de la préparation a pour but d'inactiver les enzymes cellulaires pour éviter ainsi la dénaturation des protéines et de permettre les manipulations nécessaires à la préparation des spécimens histologiques. Les fixateurs les plus couramment employés sont le formol et le liquide de Bouin. À ceux-ci viennent maintenant s'ajouter des mélanges commerciaux d'utilisation facile et efficace.

### 2.2. FORMALDÉHYDE OU FORMOL

Le formol est l'agent fixateur le plus fréquemment utilisé. Il pénètre bien et ne durcit pas trop les tissus qui peuvent ainsi être conservés longtemps sans détérioration. Il est acheté en solution aqueuse saturée contenant 40% de formaldéhyde. On considère cette solution comme du formol à 100% et on l'utilise en solution aqueuse saline ou tamponnée à 10% (4% de formaldéhyde).

*Formol à 10% salin*

Eau distillée ..... 90 mL

Chlorure de sodium ..... 0.85 à 0.90 g

Formol concentré ..... 10 mL

*Formol à 10% tamponné*

Formol concentré ..... 10 mL

Phosphate monosodique anhydre ($NaH_2PO_4$) ..... 0.35 g

Phosphate disodique anhydre ($Na_2HPO_4$) ..... 0.65 g

Eau distillée, compléter à ..... 100 mL

### 2.3. MÉLANGE DE BOUIN

Ce mélange est assez largement utilisé comme fixateur de routine. Il pénètre les tissus et il est très efficace pour la mise en évidence des corps d'inclusion de type viral.

Solution aqueuse saturée d'acide picrique (1.22%) ..... 75 mL

Formol du commerce à 40% ..... 25 mL

Acide acétique glacial ..... 5 mL

### 2.4. CARNOY

Ce mélange peut être avantageusement utilisé pour la fixation des petites pièces. En raison de sa rapidité à fixer, des pièces de 2 à 3 mm peuvent être fixées en une quinzaine de minutes.

Éthanol absolu ..... 60 mL

Chloroforme ..... 30 mL

Acide acétique glacial ..... 10 mL

### 2.5. SUSA DE HEIDENHAIN

Ce mélange est également un fixateur à action rapide. Les pièces d'épaisseur de 3 mm ou moins peuvent être fixées en moins de 2 à 3 h.

Chlorure mercurique ..... 4.5 g

Chlorure de sodium ..... 0.5 g

Acide trichloroacétique ..... 2.0 g

Acide acétique glacial ..... 4 mL

Formol concentré ..... 20 mL

Eau distillée, compléter à ..... 100 mL

### 2.6. FIXATEURS COMMERCIAUX

Plusieurs fabricants ont mis sur le marché des solutions déjà préparées qui donnent d'excellents résultats pour les colorations de routine. C'est le cas, entre autres, du Perfix® et du Tissufix®.

## 3. IMPRÉGNATION

Afin d'être en mesure d'obtenir des coupes minces dont l'épaisseur varie habituellement entre 3 et 6 µm, il s'avère nécessaire d'augmenter la rigidité du tissu. Deux moyens peuvent être utilisés à cette fin: la congélation et l'imprégnation du tissu par un matériau solide appelé milieu d'inclusion ou préférablement milieu d'imprégnation. En pratique, le milieu d'imprégnation le plus couramment utilisé est la paraffine. Celle-ci n'est toutefois pas miscible à l'eau d'où la nécessité d'utiliser des liquides intermédiaires qui sont miscibles avec l'eau, pouvant ainsi chasser l'eau du tissu et qui sont de plus miscibles avec la paraffine, permettant à cette dernière de pénétrer le tissu.

### 3.1. LA DÉSHYDRATATION

La première étape consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient. Parmi les nombreux produits pouvant être utilisés, l'éthanol est le plus couramment employé. Afin d'éviter une trop rapide rétraction du tissu et conséquemment sa distorsion, il faut procéder graduellement. La déshydratation se fait généralement par un passage du tissu dans des bains successifs en débutant avec de l'éthanol à 70% et en augmentant la concentration de 10% à la fois pour arriver au dernier bain d'éthanol absolu.

### 3.2. ÉCLAIRCISSEMENT

L'éthanol n'étant pas miscible avec la paraffine, il est nécessaire de le remplacer dans le tissu par un solvant de celle-ci. De nombreux solvants peuvent être utilisés comme agents éclaircissants, les plus couramment utilisés sont les hydrocarbures benzéniques: le toluène, le benzène ou le xylène.

### 3.3. IMPRÉGNATION

La paraffine est l'agent le plus fréquemment utilisé. Les entreprises commerciales spécialisées dans la fourniture de matériel histologique produisent leur propre marque de paraffine à laquelle sont ajoutées diverses substances destinées à améliorer l'efficacité du produit.

Les diverses manipulations relatives à la déshydratation, à l'éclaircissement et à l'imprégnation se font au moyen d'un appareil à circulation automatique dont il en existe différents modèles sur le marché.

## 4. ENROBAGE

L'enrobage consiste à inclure, dans un bloc fait de milieu d'inclusion, le tissu qui est déjà imprégné. La paraffine est généralement utilisée à cette fin. Ce bloc permet une manipulation plus facile du tissu qui peut ainsi être attaché à la pince porte-objet du microtome pour permettre la préparation des coupes minces.

## 5. CRYOTOMIE

On a recours à la congélation lorsqu'il est impossible d'utiliser l'inclusion à la paraffine pour la coupe; par exemple, lorsque l'on doit travailler sur des tissus frais, non fixés, pour effectuer des études d'immunofluorescence. On utilise également la coupe en congélation lorsque certaines étapes préparatoires à l'inclusion à la paraffine sont susceptibles d'éliminer les substances que l'on désire mettre en évidence. C'est le cas, par exemple, des lipides qui sont dissous par les solvants utilisés lors de la circulation des tissus. Il est préférable de congeler les tissus à une température inférieure à –20°C; cela peut se faire à l'aide de $CO_2$, de fréon ou d'azote liquide.

## 6. COLORATION DES COUPES

Il existe deux étapes préparatoires à la coloration proprement dite: ce sont le déparaffinage et l'hydratation.

### 6.1. ÉTAPES PRÉPARATOIRES

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu afin de permettre la pénétration des colorants. Le xylène est utilisé à cette fin; on fait passer les coupes dans deux bains de xylène pendant 3 à 5 min. La pénétration des colorants utilisés, qui sont pour la plupart en solution aqueuse, ne peut se faire que si les tissus ont été imprégnés d'eau. L'hydratation a donc pour effet de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par de l'eau. L'éthanol est alors utilisé en concentrations décroissantes en commençant par deux bains d'éthanol absolu, puis suivis de bains à 95%, à 80% et à 70%, tous d'une durée de 3 à 5 min. On termine l'hydratation par un traitement de 3 à 5 min à l'eau courante. Il est important de ne pas laisser sécher les tissus depuis le début du déparaffinage jusqu'au moment où la coupe est montée.

### 6.2. COLORATION PROPREMENT DITE

Les nombreux types de coloration peuvent être regroupés en deux grandes catégories: la coloration de routine et les colorations spéciales. Alors que la première suffit à mettre en évidence les cytoplasmes, les noyaux et les fibres de collagène, les secondes sont utilisées pour mettre en évidence des éléments tissulaires spéciaux. Il existe un très grand nombre de méthodes de coloration de routine et de coloration spéciale. Nous ne décrirons que les plus courantes susceptibles d'être employées en histopathologie virale.

### 6.3. COLORATION DE ROUTINE À L'HÉMATOXYLINE-ÉOSINE

**Solutions**

*Alcool acide*

Alcool éthylique à 70% ..... 1000 mL

Acide chlorhydrique concentré ..... 5 mL

*Eau ammoniacale*

Eau distillée ..... 1000 mL

Ammoniaque ..... 2 mL

*Eosine Y*

Éosine, solution aqueuse à 3% 100 mL

Alcool éthylique à 95% ..... 125 mL

Eau distillée ..... 375 mL

Acide acétique glacial ..... 2 gouttes

*Hématoxyline de Harris*

Hématoxyline ..... 5 g

Éthanol ..... 50 mL

Eau distillée ..... 950 mL

Alun de potasse ..... 100 g

Oxyde mercurique ..... 2.5 g

Acide acétique glacial ..... 40 mL

Dissoudre l'alun dans l'eau et l'hématoxyline dans l'éthanol. faire chauffer séparément, puis mélanger les deux solutions et porter le mélange à ébullition. Retirer du feu, ajouter lentement l'oxyde mercurique et remettre sur le feu jusqu'à l'obtention d'une couleur violet foncé puis laisser bouillir de 3 à 5 min. Faire refroidir, ajouter l'acide acétique et filtrer. La solution peut être conservée de 3 à 6 mois; filtrer avant usage.

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Colorer avec l'hématoxyline de Harris (15 min).
4. Laver à l'eau du robinet.
5. Différencier dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); déposer ensuite la lame dans un bain d'eau du robinet et vérifier au microscope la différenciation. Les noyaux doivent être rouges et le fond clair.
6. Laver à l'eau du robinet (2 à 3 min).
7. Bleuir dans l'eau ammoniacale.
8. Laver à l'eau du robinet (15 min).
9. Colorer dans la solution d'éosine (15 sec à 2 min). (L'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de roses plus ou moins vifs selon l'intensité de l'acidophilie des divers éléments cellulaires).
10. Déshydrater et monter.

**Résultats**

- Noyaux: bleu
- Cytoplasme: rose
- Fibres conjonctives (particulièrement le collagène): rose tirant sur l'orangé
- Globules rouges: rouge clair à jaune

## 6.4. MISE EN ÉVIDENCE DES GLUCIDES (MÉTHODE À L'ACIDE PERIODIQUE-SCHIFF)

**Solutions**

*Réactif de Schiff*

Fuchsine basique ..... 1 g

Eau distillée ..... 200 mL

Acide chlorhydrique 1 N ..... 20 mL

Métabisulfite de sodium ou de potassium ..... 1 g

Charbon activé en poudre ..... 2 g

Dissoudre la fuchsine basique dans l'eau distillée et laisser bouillir (5 min). Refroidir à 50°C et filtrer la solution. Ajouter l'acide chlorhydrique 1 N au filtrat et refroidir à 25°C. Ajouter le métabisulfite (Na ou K). Laisser reposer à la noirceur (18 à 24 h). Ajouter le charbon activé. Brasser (1 min). Filtrer la solution et la conserver au réfrigérateur. Cette solution peut être conservée dans une bouteille ambre bien bouchée; elle doit être limpide et ne doit pas être utilisée lorsqu'elle prend une teinte rosée.

*Eau sulfureuse*

Acide chlorhydrique 1 N (8.35 mL HCl à 100 mL dans $H_2O$) ..... 5 mL

Bisulfite de sodium ou de potassium à 10% dans $H_2O$ ..... 6 mL

Eau distillée ..... 100 mL

*Acide periodique à 1%*

Acide periodique ..... 1 g

Eau distillée ..... 100 mL

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet (10 min).
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Oxyder avec l'acide periodique à 10% (15 min).
4. Laver à l'eau courante (10 min).
5. Rincer à l'eau distillée.
6. Colorer avec le réactif de Schiff préalablement filtré (Whatman No 1) (15 min).
7. Passer à l'eau sulfureuse pour enlever le réactif de Schiff en excès (3 bains de 2 min chacun).
8. Laver à l'eau du robinet (10 min).
9. Colorer les noyaux avec l'hématoxyline de Harris en doublant le temps normal.
10. Laver à l'eau de robinet (10 min).
11. Déshydrater et monter.

**Résultats**

- Substances positives: rose à rouge-pourpre
- Noyaux: bleu
- Fond: teinte vert pâle

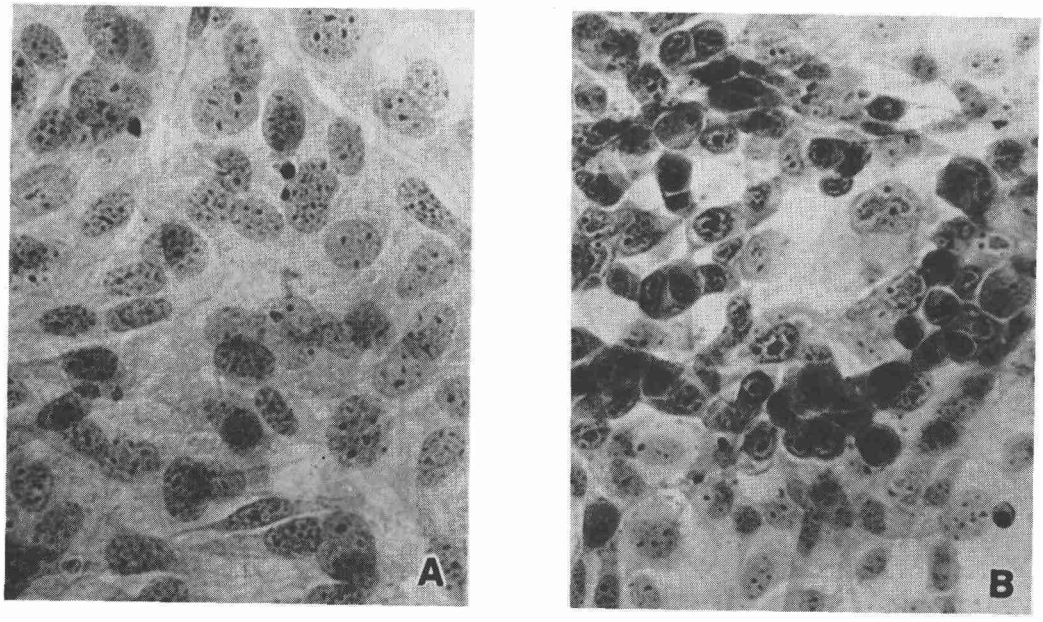


**Figure 1**

**Feuillet de cellules d'embryons de souris colorées à l'hématoxyline et à l'éosine**

Cellules non infectées (A) et cellules avec corps d'inclusion intranucléaires (B).

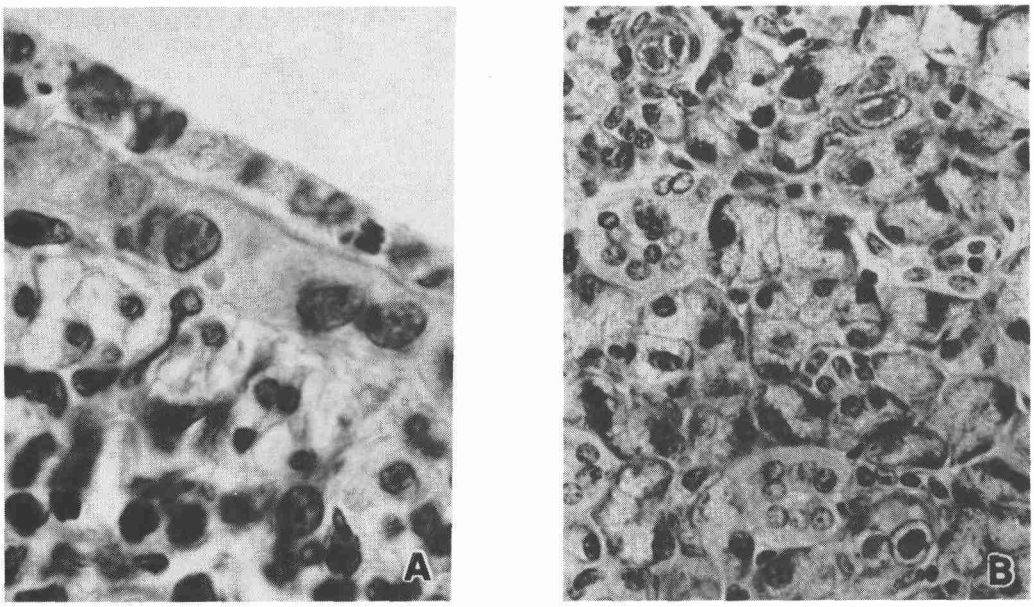


**Figure 2**

A) Coupe de poumon (coloration hématoxyline et éosine) mettant en évidence la présence d'une inclusion intracytoplasmique au niveau d'une cellule épithéliale bronchique.

B) Coupe de glandes salivaires (coloration hématoxyline et éosine) mettant en évidence la présence de corps d'inclusion intranucléaires.

## 6.5. MISE EN ÉVIDENCE DES LIPIDES (MÉTHODE À L'HUILE ROUGE O)

### Solutions

*Solution de réserve saturée d'huile rouge O*

Huile rouge O ..... 0.5 g

Alcool isopropylique (isopropanol) à 99% ..... 100 mL

*Solution de travail d'huile rouge O*

Solution saturée de réserve d'huile rouge O ..... 6 mL

Eau distillée ..... 4 mL

Mélanger, agiter 15 à 20 sec et laisser reposer 10 min. Filtrer juste avant l'usage. L'huile rouge O diluée n'est utilisable que pendant 1 à 2 h.

### Méthode

1. Déposer les coupes en congélation dans un bain d'eau courante pour enlever les résidus de fixateur et laver pendant 5 min en changeant les bains.
2. Colorer avec la solution de travail d'huile rouge O (10 min).
3. Laver à l'eau du robinet en agitant pour enlever le surplus de colorant.
4. Contrecolorer les lames à l'hématoxyline de Harris (1 min).
5. Laver à l'eau du robinet (5 min) et monter.

6. Bleuir les noyaux par un passage dans une solution aqueuse saturée de carbonate de lithium (30 sec).

7. Laver à l'eau du robinet (5 min).

8. Monter.

**Résultats**

- Lipides: rose
- Noyaux: bleu

*Remarque*: Il est important d'obtenir les coupes de tissu par cryotomie afin d'éviter l'enrobage dans la paraffine qui aurait pour effet d'extraire les lipides du tissu. Cette coloration peut être utilisée pour la mise en évidence des corps d'inclusion produits par certains poxvirus, notamment les poxvirus aviaires.

## 6.6. MISE EN ÉVIDENCE DES ACIDES NUCLÉIQUES

### 6.6.1. Méthode de Feulgen et Rossbeck

La fixation joue un rôle important et influe subséquemment sur le temps d'hydrolyse du tissu. Les agents fixateurs suivants peuvent, entre autres, être utilisés: le Carnoy, le Susa de Heidenhain et l'éthanol absolu.

**Solutions**

*Acide chlorhydrique 1 N*

HCl concentré ..... 83.5 mL

$H_2O$ ..... à 1000 mL

*Réactif de Schiff (décrit en 6.4)*

*Eau sulfureuse (décrite en 6.4)*

*Vert lumière à 0.25% dans $H_2O$*

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater à l'eau du robinet.

2. Rincer à l'eau distillée.

3. Hydrolyser les coupes dans l'acide chlorhydrique 1 N préalablement chauffé à 60°C. La durée de l'hydrolyse doit être ajustée en fonction du fixateur employé. Pour le Carnoy, 6 min; pour le Susa de Heidenhain, 18 min et pour l'éthanol absolu, 5 min.

4. Rincer à l'eau distillée froide pour arrêter l'hydrolyse.

5. Placer les coupes dans le réactif de Schiff (60 à 90 min).

6. Rincer dans trois bains d'eau sulfureuse (2 min par bain).

7. Laver à l'eau courante.

8. Rincer à l'eau distillée.

9. Contrecolorer dans la solution de vert lumière (1 min).

10. Rincer à l'eau distillée.

11. Déshydrater et monter.

**Résultats**

- ADN: mauve-violet
- Fond (cytoplasme et fibres): vert

### 6.6.2. Méthode à l'acridine orange

L'éthanol est le fixatif de choix; il est supérieur au formol et au Bouin.

**Solutions**

*Acridine orange (solution de réserve) à 1% dans $H_2O$*

*Acridine orange (solution de travail)*

Solution de réserve ..... 1 mL

Tampon phosphate (pH 6.0) ..... 1 mL

Chlorure de calcium (0.1 M) 11.1 g/ 100 mL d'$H_2O$

**Méthode**

1. Rincer les lamelles à l'eau distillée.
2. Passer rapidement dans l'eau acétique à 1% (10 sec).
3. Laver à l'eau distillée (2 min).
4. Colorer avec la solution de travail d'acridine orange (3 min).
5. Laver dans le tampon phosphate à pH 6 (1 min).
6. Différencier avec la solution de chlorure de calcium (30-60 sec).
7. Laver dans le tampon phosphate.
8. Monter.

**Résultats**

- ADN: jaune verdâtre
- ARN: rouge

## 6.7. MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES

### 6.7.1. Mise en évidence des bactéries par la méthode de Gram selon Brown et Brenn

**Solutions**

*Violet cristal à 1% dans $H_2O$*

*Bicarbonate de sodium à 5% dans $H_2O$*

*Iode de Gram (solution iodo-iodurée)*

Iode ..... 1 g

Iodure de potassium ..... 2 g

Eau distillée ..... 300 mL

*Solution de réserve de fuchsine basique à 0.25% dans $H_2O$*

*Solution de travail de fuchsine basique*

Fuchsine basique, solution de réserve ..... 10 mL

Acétone ..... 100 mL

*Acide picrique à 0.1% dans l'acétone*

*Solution d'acétone-toluène (1:1)*

*Solution d'éther-acétone (1:1)*

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Préparer le mélange colorant au moment de l'emploi (pour une lame): à 2 mL de violet de cristal à 1%, ajouter 10 gouttes de bicarbonate de sodium à 5% et agiter lentement les

deux solutions, mettre sur la coupe et laisser agir 1 min.

4. Laver à l'eau du robinet.
5. Immerger la coupe d'iode de Gram (1 min).
6. Rincer à l'eau du robinet et bien assécher la lame.
7. Décolorer avec la solution d'éther-acétone en la versant goutte à goutte sur la coupe pour enlever le surplus de colorant (5 à 10 sec).
8. Colorer avec la solution de travail de fuchsine basique (1 min).
9. Rincer à l'eau du robinet; sécher la lame à l'air pour enlever le surplus d'eau.
10. Plonger dans l'acétone.
11. Différencier dans le mélange acide picrique-acétone jusqu'à l'obtention d'une couleur jaunâtre-rosée.
12. Rincer en agitant la lame dans l'acétone.
13. Rincer brièvement dans le mélange acétone-toluène.
14. Eclaircir au toluène et monter.

**Résultats**

- Bactéries Gram+: bleu
- Bactéries Gram–: rouge
- Noyaux: rouge
- Autres éléments tissulaires: jaune

### 6.7.2. Mise en évidence des mycobactéries par la méthode de Ziehl-Neelsen

**Solutions**

*Fuchsine de Steinken*

Fuchsine basique ..... 2.5 g

Éthanol à 100% ..... 25 mL

Phénol ..... 12.5 mL

Eau distillée ..... 250 mL

*Alcool-acide à 1%*

Acide chlorhydrique ..... 3 mL

Éthanol à 95% ..... 297 mL

*Bleu de méthylène de Loefler, solution de réserve*

Bleu de méthylène de Loefler ..... 1.4 g

Éthanol à 95% ..... 100 mL

*Bleu de méthylène de Loefler, solution de travail*

Solution de réserve ..... 10 mL

Eau courante ..... 90 mL

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Colorer avec le fuchsine de Steinken (30 min).
3. Laver à l'eau du robinet (5 min).
4. Différencier les coupes avec l'alcool-acide à 1% (1 min).
5. Laver à l'eau du robinet (5 min).

6. Colorer avec le bleu de méthylène de Loefler (8 sec).
7. Rincer à l'eau du robinet (15 sec).
8. Déshydrater rapidement et monter.

**Résultats**

- Bacilles acido-alcoolo-résistants: rouge
- Éléments tissulaires: bleu très pâle.

### 6.7.3. Mise en évidence des champignons par la méthode de Grocott

**Solutions**

*Méthénamine à 3% dans $H_2O$*

*Borax (borate de sodium) à 5% dans $H_2O$*

*Nitrate d'argent à 5% dans $H_2O$*

*Solution de méthénamine d'argent*

Méthénamine à 3% ..... 25 mL

Eau distillée ..... 25 mL

Borax ..... 2 mL

Nitrate d'argent à 5% ..... 1.2 mL

*Acide chromique (trioxyde de chrome) à 5% dans $H_2O$*

*Bisulfite de sodium ($NaHSO_3$) à 1% dans $H_2O$*

*Chlorure d'or (chloroaurate de sodium) 1% dans $H_2O$*

*Thiosulfate de sodium 5% dans $H_2O$*

*Vert lumière*

Vert lumière SF ..... 0.2 g

Eau distillée ..... 500 mL

Acide acétique glacial ..... 1 mL

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater à l'eau du robinet
2. Rincer à l'eau distillée.
3. Oxyder dans l'acide chromique à 5% (1 h).
4. Laver à l'eau du robinet (10 min).
5. Rincer à l'eau distillée.
6. Blanchir dans le bisulfite de sodium à 1% (1 min).
7. Laver à l'eau du robinet (3 min).
8. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée.
9. Imprégner par la solution de méthénamine d'argent à 60°C (30 à 60 min).
10. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée.
11. Virer avec le chlorure d'or 1/500 (5 min).
12. Rincer à l'eau distillée.
13. Fixer au thiosulfate de sodium à 5% (2 min).
14. Laver à l'eau du robinet (3 min).
15. Rincer à l'eau distillée.
16. Contrecolorer avec le vert lumière (2 min).
17. Rincer à l'eau distillée.
18. Déshydrater et monter.

**Résultats**

- Champignons: noir (contour) et grisâtre (partie interne)
- Éléments tissulaires: vert

### 6.7.4. Mise en évidence des inclusions virales par la méthode à la phloxine-tartrazine de Lendrum

**Solutions**

*Solution d'hématéine de Mayer*

Hématoxyline ..... 1 g

Iodate de sodium ..... 0.2 g

Alun de potasse ou d'aluminium ..... 50 g

Acide citrique ..... 1 g

Eau distillée ..... 1 L

*Solution de phloxine B*

Phloxine B ..... 1 g

Éthanol à 70% ..... 200 mL

Chlorure de calcium ..... 1 g

*Solution saturée de tartrazine dans le monoéther éthylique d'éthylène glycol.*

**Méthode**

1. Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet.
2. Colorer dans l'hématéine de Mayer (5 à 10 min).
3. Bleuir à l'eau du robinet (10 min).
4. Colorer dans la solution phloxine B (30 min).
5. Rincer brièvement dans l'eau distillée.
6. Recouvrir les coupes de la solution de tartrazine en déposant celle-ci goutte à goutte à l'aide d'une pipette Pasteur jusqu'à l'obtention d'un changement de couleur (30 à 60 sec).
7. Placer les coupes dans l'eau distillée et vérifier la différenciation.
8. Déshydrater dans des bains d'éthanol à 60, 90 et 100%.
9. Eclaircir au toluène et monter.

**Résultats**

- Corps d'inclusion: rouge
- Noyaux: bleu
- Éléments tissulaires: jaune.

*Remarque*: La taille des virus ne permet pas leur visualisation en microscopie photonique. Par contre leur agglomération ou la production de divers composants intracytoplasmiques ou intranucléaires peuvent servir à détecter la présence d'une infection virale. Les corps de Negri observés dans la rage en sont un exemple. Les diverses inclusions virales ont des affinités tinctoriales variables et leur mise en évidence peut également être obtenue en utilisant la coloration de routine à l'hématéine de Harris par exemple.

## 7. COLORATION DE CELLULES SUR LAMES ET LAMELLES

Afin de mettre en évidence la morphologie cellulaire et la présence d'inclusions dans les cellules infectées par certains virus, il peut être utile de procéder à leur coloration. À cette fin on utilise généralement l'hématoxyline et l'éosine ou le May-Gruënwald-Giemsa.

### 7.1. COLORATION À L'HÉMATOXYLINE-ÉOSINE

**Méthode**

1. Rincer les cultures trois fois dans le PBS. Les cellules infectées doivent être manipulées avec précaution.
2. Fixer dans le Bouin ou le Carnoy (20 min).
3. Rincer à l'eau du robinet.
4. Déshydrater dans l'éthanol à 70% (2 min).
5. Rincer à l'eau du robinet.
6. Colorer à l'hématoxyline (2 min).
7. Différencier dans l'hydroxide d'ammonium (3 à 5 sec).
8. Contrecolorer à l'éosine (1 min).
9. Rincer deux fois à l'eau distillée (30 sec).
10. Déshydrater rapidement par deux passages dans l'éthanol absolu.
11. Effectuer deux passages dans le xylène (1 min chacun).
12. Monter sur lame.

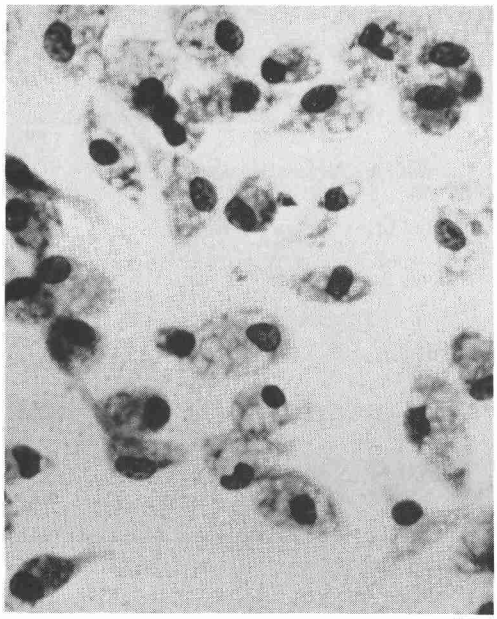

**Figure 3**

Frottis de macrophages péritonéaux colorés au May-Grüenwald-Giemsa.

### 7.2. COLORATION AU MAY-GRUËNWALD-GIEMSA

**Solutions**

*May-Gruënwald*

Alcool méthylique ..... 400 mL

May-Gruënwald ..... 1 g

Bien dissoudre le May-Gruënwald dans l'alcool méthylique et filtrer avant l'usage.

*Giemsa (solution de réserve)*

Alcool méthylique ..... 375 mL

Glycérine ..... 250 mL

Giemsa ..... 3.8 g.

Mélanger l'alcool méthylique et la glycérine, puis ajouter le Giemsa. Bien mélanger et laisser reposer dans une étuve 60°C pendant 48 h. Filtrer avant usage.

*Solution de travail de Giemsa*

Solution de réserve .....7 gouttes

Eau distillée .....5 mL

*Eau acétique à 1% dans $H_2O$*

*Éthanol-formol à 10%*

Alcool éthylique à 90% .....90 mL

Formaldéhyde du commerce à 40% .....10 mL

**Méthode**

1. Rincer les cultures trois fois dans le PBS.
2. Fixer dans l'éthanol absolu (5 min).
3. Passer à l'éthanol-formol à 10% (5 min).
4. Hydrater à l'eau du robinet (5 min).
5. Laver à l'eau distillée (10 min).
6. Colorer au May-Gruënwald-Giemsa en appliquant 20-25 gouttes directement sur la lamelle pendant 90 sec.
7. Colorer avec la solution de travail Giemsa (15 min) puis rincer à l'eau distillée.
8. Différencier dans l'eau acétique à 1% (20 sec) puis rincer à l'eau distillée.
9. Passer rapidement à l'éthanol.
10. Passer dans quatre bains de toluène.
11. Monter.

## 8. CYTOLOGIE EXFOLIATRICE

La cytologie exfoliatrice s'apparente à l'histologie par les méthodes employées. Elle est principalement utilisée comme moyen de dépistage de plusieurs types de cancers ou pour l'obtention de renseignements sur l'état gynécologique de la femme. La cytologie exfoliatrice est également utile pour le diagnostic de certaines infections virales.

### 8.1. PRÉLÈVEMENT DES SPÉCIMENS

Les méthodes de collecte varient suivant l'organe examiné. Les spécimens peuvent être prélevés par grattage au moyen d'une spatule, par aspiration au moyen d'une pipette, d'une seringue ou à l'aide d'un écouvillon.

### 8.2. PRÉPARATION DES FROTTIS

Les frottis peuvent être effectués par étalement du prélèvement directement sur une lame; cependant s'ils doivent être préparés à partir de matériel liquide, on doit procéder à la concentration des éléments cellulaires par centrifugation ou par filtration sur membranes. Dans le cas de la centrifugation, les frottis sont faits à partir du culot; dans le cas de la filtration, ils sont préparés en appuyant le filtre directement contre la lame.

### 8.3. LA FIXATION

Les cellules peuvent être fixées dans le Bouin, le Carnoy ou l'éthanol à 90%. Il est important d'éviter la dessiccation des tissus avant et après leur fixation. Si les lames ne peuvent être colorées immédiatement après fixation, elles doivent demeurer dans le fixateur ou être recouvertes d'un enduit prévenant l'évaporation. À cette fin, on peut utiliser la glycérine ou le propylène glycol qui sont hydrosolubles et peuvent ainsi être en-

levés au moment de la coloration. Il existe également des produits commerciaux comme le Cytospray® à base d'alcool isopropylique et de polyéthylène-glycol contenant à la fois le fixateur et l'enduit. Ces produits peuvent être vaporisés directement sur la lame et sont particulièrement utiles dans le cas des frottis qui doivent être acheminés au laboratoire.

## 8.4. COLORATION DES FROTTIS CYTOLOGIQUES

Plusieurs techniques de coloration peuvent être utilisées telles que la méthode à l'hématoxyline-éosine, le May-Gruënwald-Giemsa et la réaction de Feulgen. Cependant, la méthode de choix est celle de Papanicolaou.

### 8.4.1. Méthode de Papanicolaou

**Solutions**

*Hématoxyline de Harris (section 6.3)*

*Alcool-acide*

Éthanol ..... 495 mL

Acide chlorhydrique à 1% ..... 5 mL

*Ammoniaque-éthanol à 70%*

Éthanol à 70% ..... 485 mL

Hydroxyde d'ammonium ..... 15 mL

*Orange G*

Orange G ..... 0.5 g

Acide phosphotungstique ..... 0.015 g

Éthanol à 95% ..... 100 mL

*EA-50*

Vert lumière à 0.1% dans l'éthanol à 95% ..... 45 mL

Éosine à 0.5% dans l'éthanol à 95% ..... 45 mL

Brun de Bismarck à 0.5% dans l'éthanol à 95% ..... 45 mL

Acide phosphotungstique ..... 0.2 g

Solution saturée de carbonate de lithium ..... 1 goutte

**Méthode**

1. Plonger dans l'éthanol à 95% (1 min).
2. Plonger dans l'éthanol à 70% (2 min).
3. Rincer à l'eau distillée (3 min).
4. Colorer à l'hématoxyline (2 min).
5. Rincer à l'eau du robinet (1 min).
6. Rincer à l'eau distillée (1 min).
7. Plonger dans l'alcool-acide (3 sec).
8. Plonger dans l'ammoniaque-éthanol à 70% (30 sec).
9. Rincer à l'eau du robinet (2 min).
10. Plonger dans l'éthanol à 70% (2 min).
11. Plonger dans l'éthanol à 95% (2 min).
12. Colorer à l'orange G (1 min).
13. Plonger dans l'éthanol à 95% (30 sec).

14. Plonger dans l'éthanol à 95% (30 sec).
15. Colorer dans le colorant cytoplasmique EA-50 (90 sec).
16. Plonger dans l'éthanol à 95% (30 sec),
17. Plonger dans l'alcool absolu (1 min).
18. Plonger dans l'éthanol absolu (1 min).
19. Plonger dans l'éthanol absolu-toluène (50-50) (2 min).
20. Plonger dans trois bains de toluène (2 min par bain) puis monter.

**Résultats**

- Noyaux: bleu
- Cytoplasme des cellules profondes: vert-bleu
- Cytoplasme des cellules superficielles: rose
- Globules rouges: orange

## 9. MONTAGE

Cette opération effectuée après la coloration consiste à fixer, à l'aide d'une résine, une lamelle de verre sur l'échantillon histologique pour assurer la permanence de la préparation. Il existe un grand nombre de milieux de montage sur le marché; les plus utilisés sont l'Eukitt®, le Permount®, l'Immu-mount®, le Harleco® et le Malinol®.

## 10. RÉFÉRENCES

Bancroft, J.D. et Cook, H.C. 1984.*Manual of Histological Techniques*, Churchill Livingstone, New York.

Culling, C.F.A. 1974. *Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques*, 3e éd., Butterworth, Londres.

Ganter, P. et Jollès, G. 1970. *Histochimie normale et pathologique* (tome II), Gauthiers-Villars, Paris.

Hould, R. 1984.*Techniques d'histopathologie et de cytologie*, Décarie, Montréal.

Lillie, R.D et Fullmer, H.M. 1976. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*, 4e éd., McGraw-Hill, New York.

Sheehan, D.C. et Hrapchak, B.B. 1980. *Theory and Practice of Histochemistry*, 2e éd., C.V. Mosby, Saint-Louis.

# 18

# L'OR COLLOÏDAL, COMME MARQUEUR EN VIROLOGIE

Simon Garzon

L'introduction de l'or colloïdal comme marqueur ou traceur en microscopie électronique a révolutionné la cytochimie et l'immunohistochimie ultrastructurales. Ce marqueur est aujourd'hui largement appliqué, souvent de préférence à la ferritine ou à la peroxydase. Son application s'étend de la localisation des sites antigéniques (méthode d'immuno–or colloïdal), de substrats enzymatiques (méthode enzyme-or) et/ou de groupements hydrates de carbone (méthode lectine-or) à la localisation de séquences d'acides nucléiques spécifiques à l'aide de sonde d'ADN et d'ARN (méthode d'hybridation *in situ*) tant en biologie cellulaire qu'en microbiologie ou en virologie.

L'or colloïdal présente de nombreux avantages. Très dense aux électrons et de taille bien définie, on peut se le procurer dans une gamme variée de diamètres, ce qui permet des localisations doubles ou triples. Les méthodes de préparation de suspensions stables d'or colloïdal de diamètre standardisé sont maintenant bien établies. D'autre part, l'or chargé négativement, se lie à différentes macromolécules, telles les protéines et lipoprotéines par de simples liaisons électrostatiques. De plus, il donne un complexe stable sans altération de l'activité biologique de la macromolécule ainsi couplée. Finalement, sa densité, sa couleur caractéristique rouge et sa capacité d'absorber la lumière visible ou d'émettre une forte émission d'électrons secondaires en ont fait un marqueur universel adapté autant aux méthodes d'immuno-empreinte qu'à la microscopie optique ou à la microscopie électronique à transmission ou à balayage. Cependant, seules les particules d'or de faible diamètre peuvent pénétrer à l'intérieur des cellules pour marquer les macromolécules intracellulaires ce qui limite son utilisation en méthode de préenrobage, principalement à la localisation des macromolécules de surface des membranes cytoplasmiques. Par contre, en méthode de postenrobage, les complexes protéines-or permettent la localisation des macromolécules intra-

cellulaires directement sur coupes ultrafines.

La spécificité et la sensibilité des méthodes à l'or vont dépendre:

- de la qualité et de la stabilité des complexes-or
- de l'activité spécifique des anticorps (affinité et avidité), des enzymes ou des autres macromolécules utilisées
- de la préservation de l'activité biologique ou antigénique de la macromolécule cible
- de l'accessibilité de la macromolécule cible
- du blocage des groupements non spécifiques
- et des forces électrostatiques, qui dans les méthodes de post-enrobage, peuvent interférer avec le marquage spécifique et donner un bruit de fond élevé.

Ces différentes considérations ont conduit à la mise au point d'un éventail de méthodes de marquage selon les propriétés et l'accessibilité de chaque macromolécule à localiser. On suggère la lecture des différents articles de revue cités en référence. Ces méthodes qui permettent une bonne préservation de l'ultrastructure donnent un marquage ponctuel qui n'obscurcit pas la structure fine d'où leur grand intérêt en microbiologie et en virologie. Conjointement à l'avènement des anticorps monoclonaux et des sondes d'ADN complémentaires (ADNc) elles permettront de pénétrer l'intimité la plus profonde et le mode de multiplication des virus. Déjà, plusieurs études ont permis l'application des méthodes à l'or colloïdal à la détection et à l'identification des virus par imprégnation négative, la localisation dans la cellule hôte, des protéines virales structurales ou non structurales, et l'étude du transfert des glycoprotéines virales ainsi qu'à la réponse cellulaire.

La première partie de ce chapitre portera sur les méthodes de préparation de l'or colloïdal et des complexes-or car, même si certains complexes sont disponibles commercialement, il est peut-être préférable (pour le coût et la qualité) ou même indispensable de pouvoir préparer ses propres complexes, d'autant plus que la préparation de tels complexes-or est souvent simple et peu onéreuse.

## 1. PRÉPARATION DE SUSPENSIONS D'OR COLLOÏDAL MONODISPERSÉ

Les suspensions d'or colloïdal monodispersé et de diamètre défini sont **préparées par la réduction contrôlée** d'une solution aqueuse d'acide tétrachloroaurique ($HAuCl_4$) par différents agents réducteurs (Tableau 1). Pour éviter toute interaction et déstabilisation de l'or, la verrerie doit être scrupuleusement lavée, rincée à l'eau bidistillée filtrée, avant d'être siliconée. Toutes les solutions sont préparées à partir de produits de haute pureté avec de l'eau bidistillée et filtrée sur membrane stérile de 0.22 µm. L'acide tétrachloroaurique ($HAuCl_4$) cristallisé (en ampoule de 1 g) étant très hydrophile, il est préférable de préparer une solution-mère à 1% dans l'eau bidistillée. Celle-ci peut être conservée plusieurs mois à 4°C.

Tableau 1

Préparation de suspensions d'or colloïdal de diamètre défini

| Diamètre des particules d'or (nm) | Agent réducteur |
|---|---|
| 2-3 | Thiocyanate de Na |
| 2-5 | Sodium borohybride |
| 3-5 | Phosphore à saturation dans l'éther |
| 5-12 | Phosphore dans l'éther |
| 6-10 | Ultrasons (20 Kc, 125 W) |
| 8-13 | Acide ascorbique |
| 3-17 | Citrate de sodium et acide tannique |
| 8-150 | Citrate de sodium |

### 1.1. MÉTHODE AU THIOCYANATE DE SODIUM OU DE POTASSIUM (NaSCN OU KSCN)

1. Déposer dans un erlenmeyer traité au silicone: 50 mL d'$H_2O$ bidistillée contenant 0.5 mL de $HAuCl_4$ à 1% et 0.75 mL de $K_2CO_3$ 0.2 M.

2. Ajouter sous agitation 0.3 mL de NaSCN (ou KSCN) 1 M. Laisser le mélange (jaunâtre) toute la nuit à l'obscurité, à la température de la pièce. Celui-ci vire au jaune-brun. Un séjour prolongé de plusieurs jours donne des particules d'or de taille supérieure (rouge-brun) qui peuvent être éliminées par centrifugation à 10 000 x *g* pendant 10 min.

### 1.2. MÉTHODE AU SODIUM BOROHYDRIDE

Pour des particules d'or colloïdal de 2 à 5 nm.

1. Mélanger 150 µL d'une solution aqueuse à 4% de $HAuCl_4$ et 200 µL de $K_2CO_3$ 0.2 M, à 40 mL d'eau bidistillée refroidie à 4°C.

2. Ajouter rapidement plusieurs aliquotes, de 400 µL, d'une solution fraîche de sodium borohydride à 0.5 mg/mL au mélange maintenu sous agitation vigoureuse. Ajouter le sodium borohydride jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge-orangée. Maintenir l'agitation pendant 5 min supplémentaires.

### 1.3. RÉDUCTION PAR LE PHOSPHORE

Une solution saturée de phosphore blanc est préparée dans du diethyl éther à 100%. Le phosphore réagissant rapidement au contact de l'air, il faut d'abord découper les bâtons de phosphore en petits fragments sous l'eau, puis les sécher quelques secondes sur un papier filtre et ensuite les transférer rapidement dans le diethyl éther dans une fiole brune hermétiquement close. Laisser dissoudre sous légère agitation pendant au moins 2 h.

**Des précautions doivent être prises pour la manipulation du phosphore, produit inflammable et explosif. Garder à portée de la main une solution de $CuSO_4$ à 1% pour neutraliser le phosphore si celui-ci s'enflammait.**

#### 1.3.1. Particules de 3 nm

1. Ajuster le pH d'une solution aqueuse de 100 mL d'$HAuCl_4$ à 0.01% à pH 7.2 avec du $K_2CO_3$ 0.2 M. Chauffer jusqu'à ébullition.

2. Dès l'apparition de l'ébullition, ajouter 0.5 mL de la solution saturée de phosphore dans le diéthyl éther et mélanger. La réduction se signale par une couleur rouge-orangée.

### 1.3.2. Particules de 5 nm

1. Ajouter 3 mL de $HAuCl_4$ à 1% dans 240 mL d'eau bidistillée, puis ajuster à environ pH 9 avec 5.4 mL de $K_2CO_3$ 0.2 N.

2. Ajouter rapidement 2 mL d'une dilution 1:4 de la solution de phosphore dans l'éther (en essayant de réduire le contact avec l'air).

3. Mélanger doucement pendant 15 min à la température de la pièce, puis chauffer pendant 20-30 min pour éliminer l'éther et développer la réduction de l'or. Refroidir à 4°C et utiliser cette solution dans les 14 jours.

## 1.4. MÉTHODE AUX ULTRASONS

1. Pour des particules d'or colloïdal de 6 à 10 nm, mélanger 0.1 mL de $HAuCl_4$ à 1% à 50 mL d'eau bidistillée, puis neutraliser le mélange avec du $K_2CO_3$ 0.2 M.

2. Ajouter ensuite 0.5 mL d'alcool éthylique et traiter aux ultrasons (à 20 Kc et 125 W) avec une tige à bout plat.

## 1.5. RÉDUCTION PAR L'ACIDE ASCORBIQUE

1. Pour des particules d'or de 8 à 13 nm. Mélanger 1 mL de $HAuCl_4$ à 1% et 1.5 mL de $K_2CO_3$ 0.2 M à 25 mL d'eau bidistillée à 4°C.

2. Ajouter sous agitation 1 mL d'une solution aqueuse à 0.7% d'acide ascorbique. La couleur vire au pourpre–rouge.

3. Compléter le volume à 100 mL avec de l'eau bidistillée et chauffer jusqu'à l'obtention d'une couleur rouge.

## 1.6. MÉTHODE À L'ACIDE TANNIQUE

Cette méthode permet de préparer des particules d'or entre 3 et 25 nm de diamètre selon la concentration d'acide tannique utilisée. On obtient des particules de 3 nm à la plus forte concentration d'acide tannique-(Galloylglucose) (Mallinckrodt, St-Louis).

Le $K_2CO_3$ sert à compenser l'effet acidifiant de l'acide tannique et maintient le pH entre 7.5 et 8. Il n'est pas nécessaire d'en ajouter lorsque le volume d'acide tannique est égal ou inférieur à 0.5 mL.

**Solution A:** 1 mL de $HAuCl_4$ à 1% dans 79 mL d'eau bidistillée.

**Solution B:** selon le diamètre des particules désirées.

| Diamètre de l'or (nm) | 3 | 6 | 8 | 10 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|
| Citrate trisodique à 1% (mL) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Acide tannique à 1% (mL) | 5 | 1 | 0.5 | 0.1 | 0.01 |
| $K_2CO_3$ 25 mM (mL) | 5 | 1 | – | – | – |
| $H_2O$ compléter à (mL) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |

1. Chauffer les solutions A et B sur une plaque chauffante à 60°C.

2. Ajouter sous agitation les 20 mL de la solution B à 80 mL de la solution A.

3. Chauffer ensuite la solution jusqu'à ébullition puis la refroidir et la conserver à 4°C.

4. Aux concentrations les plus élevées d'acide tannique, la réduction (couleur rouge vin) s'effectue en quelques secondes et le temps de réaction augmente graduellement à mesure que diminue la concentration d'acide tannique. En l'absence d'acide tannique, la réduction peut prendre jusqu'à 60 min à 60°C.

### 1.7. RÉDUCTION PAR LE CITRATE DE SODIUM

Dans cette méthode, le diamètre des particules d'or colloïdal sera inversement proportionnel à la concentration du citrate de sodium utilisée.

#### 1.7.1. Particules d'or de 15 nm

1. Chauffer jusqu'à ébullition 100 mL d'une solution aqueuse à 0.01% de $HAuCl_4$.

2. Ajouter rapidement (d'un jet) 4 mL de citrate trisodique à 1% et maintenir l'ébullition. La réduction est complétée à l'apparition d'une couleur lie de vin. Refroidir.

#### 1.7.2. Particules d'or de 40 nm

La méthode est identique, mais on ajoute seulement 2.8 mL de citrate de sodium 1%. Pour des diamètres supérieurs, il suffit de diminuer progressivement la concentration du citrate.

#### 1.7.3. Particules d'or de 8 nm

Dans ce cas-ci, la méthode est inversée: l'or est ajouté au citrate.

1. Faire bouillir 115.5 mL d'eau ultrapure et y ajouter 7.5 mL de citrate trisodique à 1%; maintenir l'ébullition pendant encore 5 min.

2. Ajouter d'un jet 0.625 mL de $HAuCl_4$ à 2% et laisser bouillir jusqu'à la formation d'une couleur rouge lie de vin. Refroidir et conserver.

## 2. PRÉPARATION DE COMPLEXES MARQUÉS

L'or colloïdal est un colloïde hydrophobe constitué de particules métalliques chargées négativement (en suspension aqueuse elles se repoussent) qui peuvent lier des macromolécules par adsorption électrostatique. Il s'agit d'interactions relativement stables qui n'affectent en rien l'activité de la molécule marquée.

L'adsorption des protéines sur l'or colloïdal est influencée par le pH et la concentration des protéines, mais aussi par la force ionique des tampons ainsi que par le diamètre des particules d'or. Le couplage de protéines à des particules d'or de plus de 40 nm de diamètre donne généralement des rendements inférieurs et la stabilité aux électrolytes diminue. Pour des particules d'or colloïdal de diamètre donné, le nombre de sites de liaison pour différentes protéines est inversement proportionnel à la masse moléculaire de la protéine, mais directement proportionnel au diamètre des particules d'or. Les complexes sont de tailles élevées et leur pénétration à travers la membrane cytoplasmique sera limitée à des molécules couplées à des particules d'or de très petite taille (2 à 30 nm). Le pH optimal d'adsorption d'une protéine sur l'or est situé au niveau ou légèrement au-dessus de son pH isoélectrique (pHi).

## 2.1. DÉTERMINATION DES CONDITIONS OPTIMALES DE COUPLAGE

### 2.1.1. Détermination de la stabilité de l'or en fonction du pH

1. Préparer les tampons suivants à une concentration de 100 mM:

   - tampon citrate–phosphate pH 4 à 6.5

   - tampon phosphate pH 7 à 7.6

   - tampon Tris–HCl pH 8 à 9

   - tampon carbonate pH 9.5 à 11

2. Déposer 7 µL de chacun des tampons dans les puits d'une microplaque et ajouter à chaque puits 9.3 µL d'or. Incuber 5 min à la température de la pièce, un changement de couleur du rouge vers le violet ou le bleu pâle indique une déstabilisation de l'or. **Noter l'intervalle de pH où la couleur rouge est maintenue.**

### 2.1.2. Détermination des conditions optimales de pH

1. La macromolécule purifiée est diluée à raison de 5 à 10 mg/ mL dans de l'eau bidistillée.

2. Déposer dans les puits d'une microplaque 90 µL d'or à différents pH et ajouter 10 µL de protéine. Incuber 10 à 15 min à la température de la pièce. La stabilité du complexe protéine–or selon le pH est visualisée et considérée stable si la couleur reste rouge. Il est recommandé de travailler à un pH de 0.5 unité plus élevé que le pHi de la macromolécule.

### 2.1.3. Détermination de la concentration minimale de protéine pour stabiliser l'or colloïdal

1. Déposer 20 µL d'eau bidistillée dans une série de puits d'une microplaque ajouter 20 µL d'une solution de 500 ou 1000 µg/mL de protéine dans le premier puits, puis dans les puits suivants 20 µL des dilutions successives en volumes égaux de cette solution protéique.

2. Déposer 100 µL d'or tamponné au pH requis dans chacun des puits à l'exception du dernier. Les mélanges sont incubés 15 min à la température de la pièce.

3. Ajouter 20 µL d'une solution de NaCl à 10% dans chaque puits et laisser réagir pendant 5 min, visualiser et déterminer la concentration de protéines du dernier puits où la couleur rouge est maintenue. La dernière dilution qui stabilise 100 µL d'or correspond à la concentration minimale stabilisante de protéine par millilitre.

Dans la majorité des cas, une déstabilisation de l'or se signale par un virage de la couleur au bleu. Dans ce cas, les particules de 5 nm obtenues par la méthode à l'acide tannique qui visualise s'il y a déstabilisation, il faut ajouter 5 µL de peroxyde d'hydrogène à 30% par millilitre de la solution protéine–or. Pour les particules d'or produites par la méthode au thiocyanate, la déstabilisation donne un mélange légèrement voilé lorsqu'examiné en lumière diffuse, généralement la concentration minimale de protéine ainsi déterminée pour stabiliser l'or colloïdal est doublée ou augmentée de 10% lors du couplage.

## 2.2. MÉTHODES DE COUPLAGE DES MACROMOLÉCULES À L'OR COLLOÏDAL

### 2.2.1. Principe général

La protéine bien purifiée est dialysée contre de l'eau, une solution saline de NaCl 5 mM ou un tampon, tel que le tampon Borax–HCl 2 mM à pH 9 pour les immunoglobulines, avant d'être centrifugée ou filtrée (0.22 µm). Ces étapes préliminaires permettent d'éliminer les impuretés, les agrégats mais surtout les électrolytes qui pourraient interférer avec l'adsorption des macromolécules.

1. Le pH de l'or colloïdal est ajusté à 0.5 unité au-dessus du pHi de la protéine avec du $K_2CO_3$ 0.2 M ou du HCl 0.1 N. Pour éviter de colmater l'électrode du pH-mètre il est conseillé de suivre la méthode suivante: ajouter 2 gouttes de polyéthylène glycol 20 000 (PEG 20M), en solution aqueuse à 1% à un aliquote de 5 mL d'or pour le stabiliser avant d'effectuer la lecture, ensuite déterminer le volume de $K_2CO_3$ ou HCl nécessaire pour ajuster le pH à la valeur requise.

2. Ajouter à l'or, la protéine à la concentration minimale stabilisante déterminée, majorée de 10%.

3. Après quelques minutes (2 à 3 min), ajouter 20 µL de PEG à 1% et centrifuger les complexes (protéines-or) à 12 000 x *g* pendant 5 min pour des particules d'or de 50 nm, à 40 000 x *g* ou 60 000 x *g* pendant 60 min pour des particules d'or de respectivement 12 nm et 5 nm.

4. L'or métallique, non couplé, forme un culot ferme qui n'est pas resuspendu. Le sédiment constitué par les complexes protéines-or est resuspendu dans un tampon iso-osmotique (100 mM) à un pH compatible avec l'activité biologique et avec la stabilité de l'or. Ajouter au tampon, un agent stabilisant (PEG 20M) ou albumine sérique bovine (type V), ainsi qu'un inhibiteur bactérien comme l'azoture de sodium à 0.02%.

5. Les complexes peuvent être filtrés sur membrane de 0.22 µm (s'assurer que le type de filtre n'adsorbe pas la protéine) ou purifiés par plusieurs cycles d'ultracentrifugation ou encore par centrifugation en gradient de saccharose (10 à 30%) ou de glycérol. Cette dernière méthode permet de récolter des complexes de taille uniforme et d'éliminer la protéine libre ou les agrégats d'or qui ont tendance à se former lors de la conjugaison. Les complexes peuvent aussi être concentrés dans un sac à dialyse sur un gel de silice et purifiés par chromatographie sur de petites colonnes de Sephacryl S–400. Les fractions actives ont alors moins tendance à agréger ou à agglutiner.

La mesure de la densité optique entre 510 et 550 nm donne un pic d'adsorption avec un maximum à 520 nm. Il est recommandé de suspendre ceux-ci à une concentration donnant une lecture de densité optique de 2.5–10 à 520 nm, pour standardiser les complexes protéine-or .

Le diamètre des particules d'or peut-être vérifié au microscope électronique. Des grilles recouvertes de formvar sont traitées 10 min sur une goutte de poly–L–lysine (masse moléculaire 70 000) à 0.01% à pH 7.4 avant d'être rincées à l'eau distillée puis séchées. Déposer sur la grille une goutte d'or colloïdal ou des complexes–or. Diluer ces derniers dans un tampon Tris–HCl 20 mM à pH 8.2 à une densité optique de

0.25, à 520 nm et incuber 10 min. Rincer de nouveau et prendre une série de micrographies calibrées à l'aide de cristaux de catalase en coloration négative.

Les complexes sont de préférence conservés à 4°C et restent stables pour des durées de plusieurs mois à un an, en présence d'un inhibiteur bactérien tel l'azoture de sodium à 0.02%. Il est possible de les congeler en présence de 50% de glycérol, ou à –70°C sous forme de microgouttes (25 µL) dans l'azote liquide.

### 2.2.2. Immunoglobulines-Or

La préparation de ce type de complexes s'avère délicate car même purifiées par chromatographie d'affinité, les immunoglobulines renferment une population hétérogène d'IgG avec des pHi différents. En revanche, plusieurs de ces immunoglobulines sont instables en solution à faible concentration ionique et auront tendance à s'agréger à pH neutre. Plusieurs protocoles ont été proposés et dépendent du type d'immunoglobuline à coupler.

L'adsorption des anticorps monoclonaux (AcM) est plus facile puisque leur pHi peut être mieux défini. Les AcM–Or constituent d'excellents réactifs en immunocytochimie directe.

#### 2.2.2.1. Préparation des immunoglobulines pour l'adsorption

Les IgG de chèvre, de lapin et de souris (1 mg/mL) purifiées par chromatographie d'affinité, sont dialysées contre un tampon 2 mM Borax–HCl à pH 9 pendant 4 h, puis centrifugées, juste avant usage, à 100 000 x *g* pendant 1 h à 0°C.

#### 2.2.2.2. Détermination de la concentration minimale stabilisante de protéine

La concentration minimale stabilisante de protéine est déterminée par le test de floculation au NaCl et le pH de la solution d'or est ajusté à pH 9 avec du $K_2CO_3$ 0.2 N (voir section 2.1.3). Centrifuger l'or à 4800 x *g* pendant 20 min pour des particules de 5 nm ou à 250 g pendant 20 min pour des particules de 20 à 40 nm. Faire une série de dilutions linéaires de l'IgG dans des puits d'une microplaque selon le tableau suivant:

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| IgG diluée 1:3 ou 1:5 (µL) | 25 | 20 | 15 | 10 | 5 | 2.5 | 0 |
| Tampon borax pH 9 (µL) | 75 | 80 | 85 | 90 | 95 | 97.5 | 100 |

Déposer dans chaque puits 500 µL d'or colloïdal à pH 9, agiter puis laisser reposer 2 min avant d'ajouter 100 µL de NaCl à 10% par puits. Après agitation, mesurer l'absorbance à 520 nm, ou évaluer visuellement. La dernière dilution bien rosée correspond à la concentration minimale d'immunoglobuline nécessaire pour saturer l'or colloïdal.

#### 2.2.2.3. Préparation du complexe IgG–or

1. À la concentration minimale stabilisante d'immunoglobuline, majorée de 10%, mélanger un volume correspondant d'or à pH 9.

2. Après 2 min de contact, ajouter le volume requis d'une solution filtrée d'albumine sérique bovine (ASB) à 10% dans un tampon Borax-HCl à 2 mM pour atteindre une concentration finale de 1%.

3. Centrifuger le mélange à 60 000 x *g* pendant 1 h pour des particules d'or de 5 nm ou à 14 000 x *g* pour des particules de 20 à 40 nm. Aspirer délicatement le surnageant, recueillir le culot mobile et le suspendre dans 10 mL de tampon Tris–HCl 20 mM à pH 8.2 contenant 1% d'ASB.

4. Après une nuit de repos à 4°C, centrifuger de nouveau. Le complexe IgG–or est alors recueilli dans le même tampon Tris–HCl-ASB additionné d'azoture de sodium à 0.02%. Le complexe peut être filtré sur une membrane de 0.22 µm.

5. La dilution est standardisée pour qu'une dilution 1:20 du complexe donne une absorbance à 520 nm de 0.5, 0.35 ou 0.25 pour de l'or respectivement de 40 nm, 20 nm ou 5 nm de diamètre, le tampon Tris–HCl–ASB servant de témoin.

Ces complexes-or ont souvent tendance à former des agrégats ou des agglutinats dûs à une déstabilisation causée par l'addition du tampon Tris-HCl et les rendements sont parfois décevants. Avant usage, on recommande d'effectuer une centrifugation à faible vitesse, à 4 800 x *g* pendant 20 min pour l'or à 5 nm et à 250 x g pendant 20 min pour l'or de 20 à 40 nm de diamètre. Cette opération vise à éliminer ces agrégats qui peuvent donner un bruit de fond élevé lors de l'immunomarquage.

#### 2.2.2.4. Anticorps monoclonaux–or

Pour les anticorps monoclonaux, le pH optimal d'adsorption des protéines est déterminé de préférence par électrofocalisation sur gel de polyacrylamide ou d'agarose. Le pH de l'or est alors ajusté au pHi de l'AcM avec du $H_3PO_4$ à 0.2 M ou du $K_2CO_3$ à 0.2 M. Par la suite, suivre la méthode décrite pour les anticorps hétérogènes en effectuant le changement suivant. Avant l'addition du ASB à 10% au mélange, s'assurer que le pH est bien à 9, sinon l'ajuster avec du NaOH 0.5 M.

### 2.2.3. Protéine A-or

La protéine A, extraite de la paroi de *Staphylococcus aureus*, se lie spécifiquement au fragment Fc des immunoglobulines G de plusieurs espèces animales. Elle présente une forte affinité avec les IgG humaines, les IgG de lapin, de cobaye, de cochon ou de chien. Cette affinité est plus variable avec les IgG de boeuf, de cheval ou de souris, mais faible avec les IgG de rat, de mouton ou de chèvre. La protéine A présente aussi une certaine affinité avec les IgA, IgM et IgE mais pas avec les IgD (Goodswaard *et al.* 1978). La protéine A, a une masse moléculaire de 42 000, un pHi de 5.1 et ne présente plus que deux des quatre sites de réaction mis en évidence dans la paroi de la bactérie. La liaison protéine A–IgG est forte et rapide, et l'équilibre est atteint en 30 min à des températures de 4°C à 37°C, la majorité se liant dès les premières minutes.

Le complexe protéine A–or, beaucoup plus stable, constitue une excellente alternative aux IgG–or, dans la mesure où l'affinité de la protéine A pour les IgG utilisées est effective.

L'adsorption de la protéine A à l'or colloïdal s'effectue à pH entre 5.5 et 6.

1. Des concentrations de 60, 50 ou 30 µg de protéine A dissoute dans 0.2 mL d'eau sont nécessaires à la stabilisation de 10 mL d'or d'un diamètre respectif de 3 nm, 7 à 10 nm ou 15 nm. *Il est préférable d'ajouter l'or à la protéine*, et non l'inverse, pour éviter la formation d'agrégats.

2. Centrifuger le mélange 1 h à 4°C à 12 000 x *g*, 40 000 x *g* ou 60 000 x *g*, selon le diamètre de l'or. Resuspendre le culot dans 1.5 mL de saline phosphatée 100 mM pH 7.3 contenant 0.02% PEG 20M et 0.02% d'azoture de sodium. Le complexe protéine A–or ainsi obtenu est stable plusieurs mois à 4°C .

### 2.2.4. Protéine–G–or

Une nouvelle alternative, encore plus intéressante que la protéine A, est la protéine G isolée à partir de la paroi d'une souche de *Streptococcus* humain (G–148) ou encore obtenue par recombinaison génétique. En effet la protéine G est possède une plus grande avidité et affinité que la protéine A pour les IgG, y compris pour les IgG de souris, de rat ou de chèvre. Nous avons réalisé récemment le couplage de la protéine G à l'or.

1. Ajouter, sous agitation, à 0.25 mg de protéine G dissoute dans 100 µL d'eau distillée, 10 mL d'or colloïdal à pH 5.

2. Centrifuger à 12 000 x *g* pendant 30 min

3. Resuspendre le sédiment rouge sombre dans 1 mL de tampon phosphate à 100 mM, pH 7.2 contenant 0.2 mg/mL de PEG 20M.

### 2.2.5. Enzymes-or

En se fondant sur les principes de base des techniques d'or, on a développé une méthode pour la localisation sur coupe ultrafine d'un substrat, par son enzyme correspondante couplée à des particules d'or. Les conditions optimales de couplage sont déterminées par les tests préliminaires décrits dans la section 2.1, en tenant compte des propriétés des enzymes dont leur activité à des intervalles de pH restreints, et leur sensibilité aux températures. Les complexes enzyme–or ont une durée de vie à 4°C qui ne dépasse pas 10 jours en général. Nous citerons deux de ces méthodes qui présentent un intérêt pour l'identification sur coupe des acides nucléiques viraux, soit l'ARNase–or et l'ADNase–or.

**ARNase-or**

1. Dissoudre 0.1 à 0.5 mg d'ARNase dans 0.2 mL d'eau et ajouter à 10 mL d'or de 15 nm à pH 9 (pH de liaison).

2. Après centrifugation à 25 000 *g* pendant 30 min à 4°C, le sédiment est resuspendu dans du tampon PBS-PEG pH 7.3 (pH de l'activité enzymatique).

**ADNase-or**

1. Dissoudre 0.1 à 0.5 mg d'ADNase–I dans 0.2 mL d'eau et les ajouter à 10 mL d'or de 15 nm à pH 6.

2. Après centrifugation, le sédiment est resuspendu dans du tampon PBS-PEG pH 6.

### 2.2.6. Lectine-or

Les lectines sont utilisées pour l'identification et la localisation de groupements d'hydrates de carbone spécifiques. Certaines applications ont été faites en virologie pour différencier les sous-types de certains virus enveloppés ou pour étudier le transport des glycoprotéines virales. Le mode de couplage est identique à celui qui a été décrit précédemment, tout en respectant les conditions de couplage (pH et concentration) de chaque lectine.

### 2.2.7. Streptavidine–or

Le système biotine-avidine offre plusieurs avantages dont une forte affinité, et des complexes très stables. L'avidine isolée du blanc d'oeuf a un pHi de 10, ce qui rend difficile sa conjugaison à l'or. Par contre, la streptavidine extraite de *Streptomyces avidini* avec un pHi de 6.4 permet une meilleure conjugaison.

1. À 20 mL d'or ajusté à pH 7.4 avec 200 µL de $NaHCO_3$ 1 M, ajouter d'abord 0.5 mL d'une solution de streptavidine à 1 mg/mL dans du tampon PBS 1 mM pH 7.4, puis 200 µL de PEG 6 000 à 2%.

2. Centrifuger 30 min à 10 000 rpm (particules d'or de 2 à 5 nm) ou à 3 000 rpm (10 nm).

3. Placer le surnageant sur un coussin de saccharose à 37.5% dans un tampon PBS 1 mM contenant 0.02% PEG et centrifuger 30 min à 40 000 rpm (2 à 5 nm) ou 10 000 rpm pour (10 nm) dans un rotor SW40 de Beckman.

4. Suspendre le culot dans du PBS 0.1 M pH 7.4 contenant 0.02% de PEG et 0.05% d'azoture de sodium.

La streptavidine-or se fixe spécifiquement à la biotine et peut être utilisée aussi bien avec des IgG–biotinylées, des lectines-biotinylées ou des sondes d'ADNc biotinylées pour la localisation des macromolécules correspondantes.

**Conditions de couplage de quelques lectines à 10 mL d'or**

| Lectines | Spécificité | pH | µg |
|---|---|---|---|
| *Ricinus communis*-I | ß-D-Gal | 8.0 | 130 |
| *Ricinus communis*-II | ß-D-Gal, Gal NAc | 8.0 | 130 |
| Arachide | ß-D GAL | 6.3 | 130 |
| *Helix pomatia* | α-D-GalNAc | 7.4 | 65 |
| Soya | α-D-GalNAc, ß-D-GalNAc | 6.1 | 65 |
| *Lens culinaris* | α-D-Man, a-D-Glc, a-L-Fuc | 6.9 | 130 |
| *Lotus tetragonolobus* | α-L-Fuc | 6.3 | 130 |
| *Ulex europeus* lectine I | α-L-Fuc | 6.3 | 250 |
| Agglutinine de germe de blé (WGA) | ß-D-GlcNac | 7.0 | — |
| Concanavaline A | α-D-Man, α-D-Glc | 8.0 | 250 |
| *Bandeireae simplicifolia* isolectine-B4 | α-D-Gal, α-D-GalNAc | 6.2 | 250 |
| Peroxydase | Concanavaline | 8.0 | 65 |

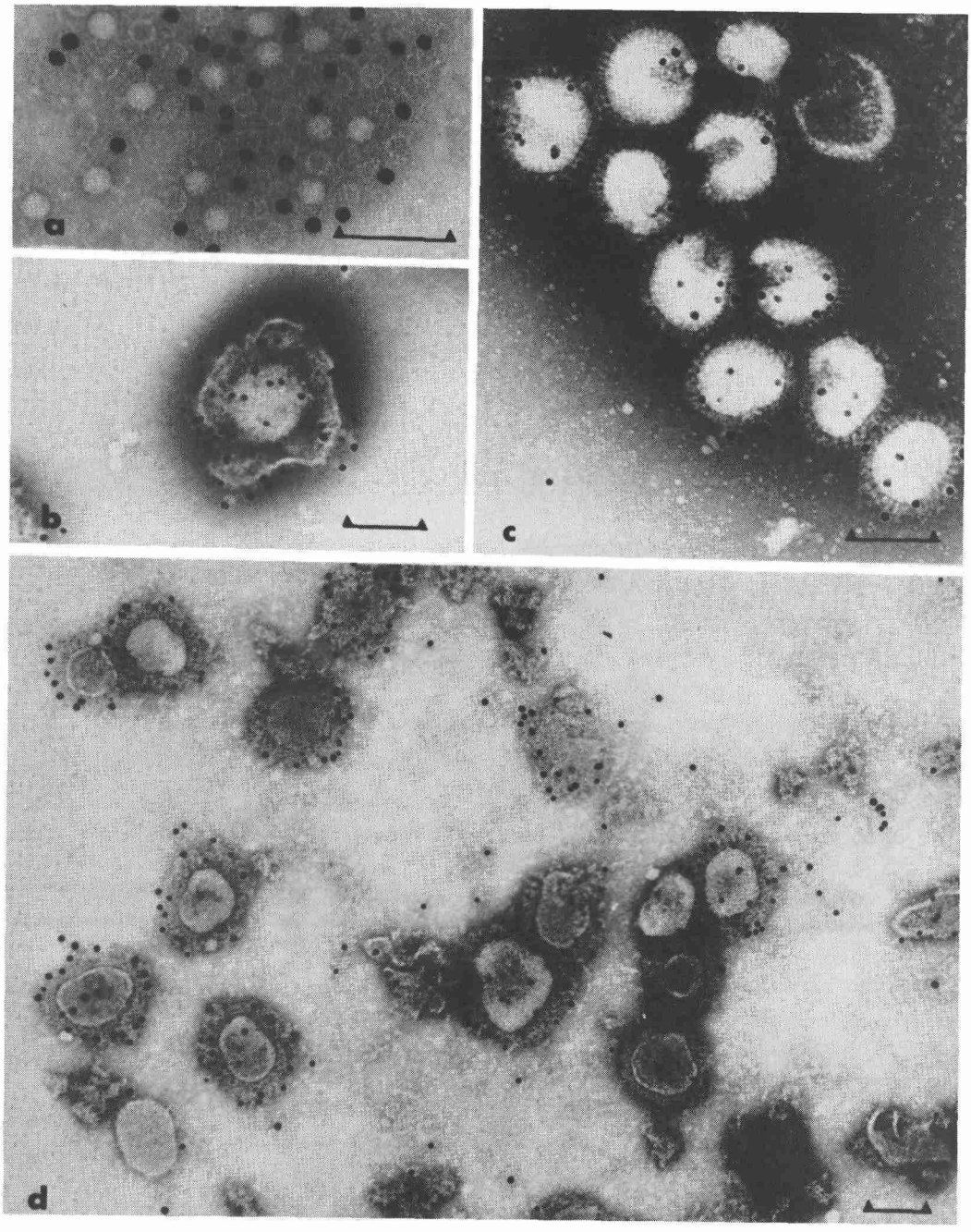


**Figure 1**

Identification de particules virales par immuno-marquage à l'aide de sérum polyclonal homologue et de la protéine A-or en coloration négative

Virus de la densonucléose (a), virus *Herpes simplex* type I (b), virus influenza type B (c) et coronavirus de dinde (d) (Echelle = 0.1 µm).

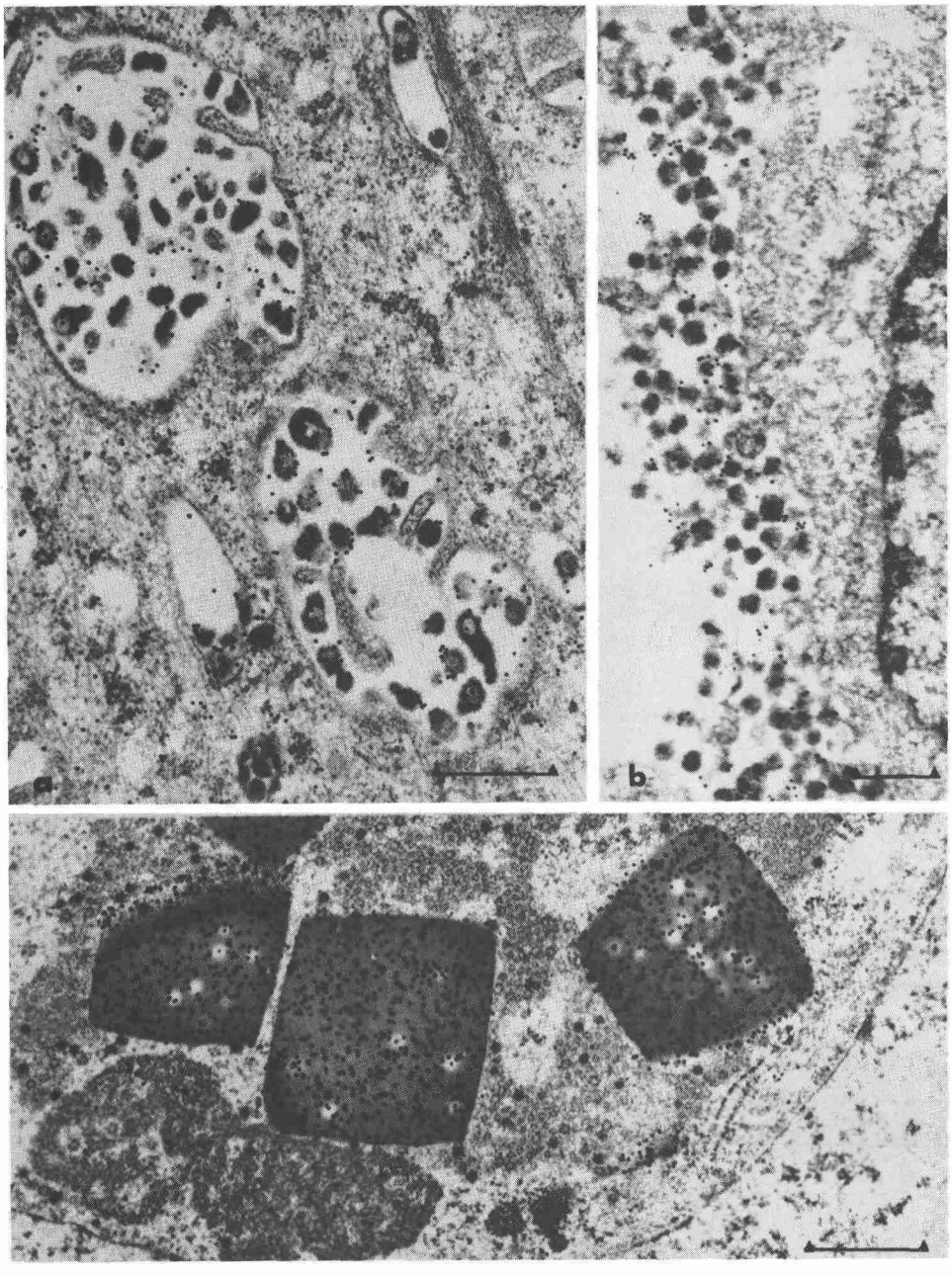


**Figure 2**

**Localisation d'antigènes viraux sur coupes ultrafines**

Virus herpès bovin IBR sur cellules MDBK localisé avec un sérum polyclonal bovin et la protéine A-or (a). Virus de l'immunodéficience humaine (HIV) sur cellules H9 localisé par un sérum monoclonal anti-p24 une protéine de la capside et un anti-IgG de souris couplé à l'or (b). Virus de la polyédrose cytoplasmique sur cellules de *Lymantria dispar*: localisation de la polyédrine par un sérum polyclonal de lapin anti-polyèdre et de la protéine A-or (c). Fixation à la glutaraldéhyde 1% et enrobage à l'Araldite 502 (Échelle = 0.5 µm).

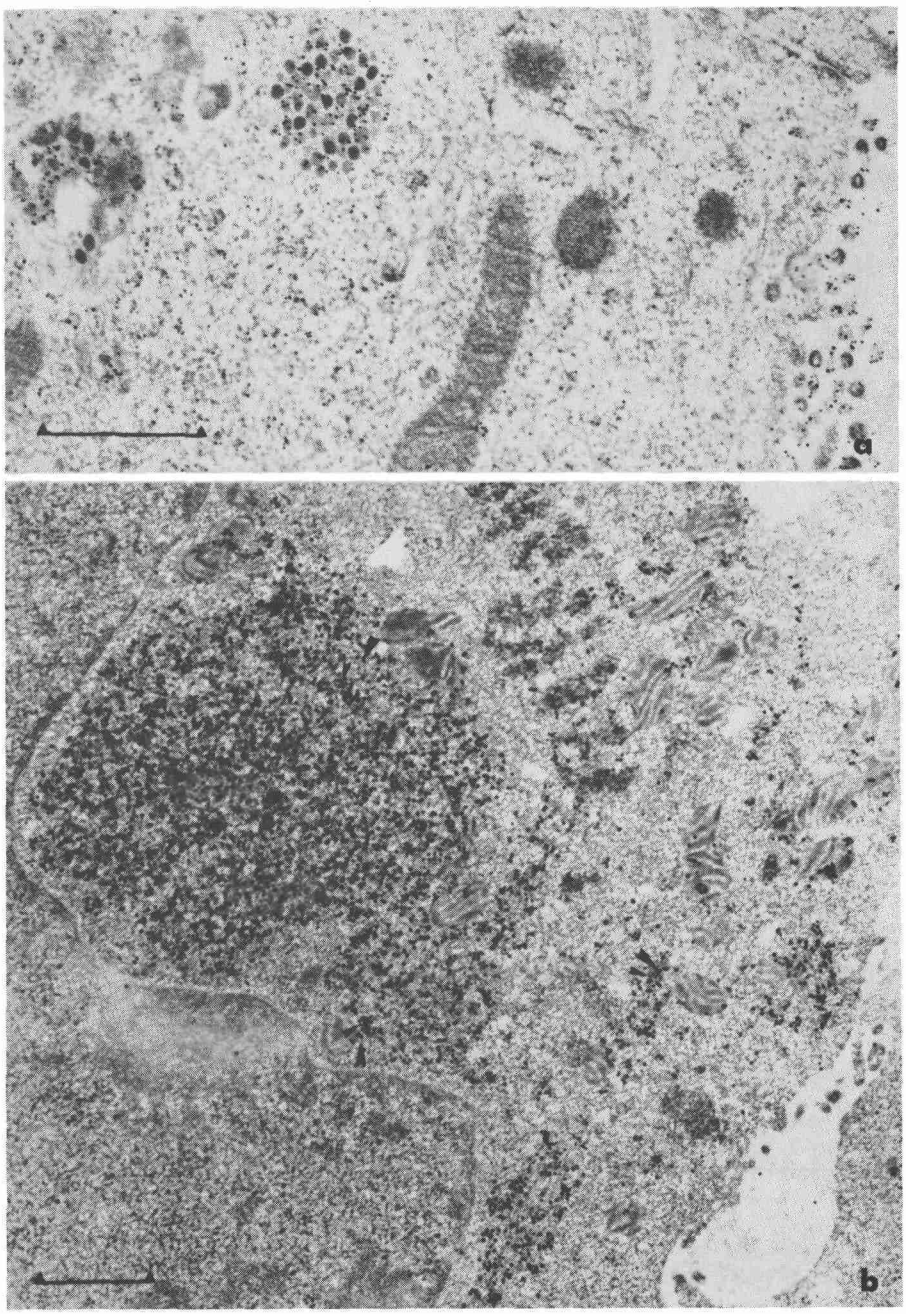


**Figure 3**

**Localisation d'antigènes viraux sur coupes ultrafines**

Coronavirus de dinde sur cellules HRT-18 localisés par un sérum polyclonal de lapin et la protéine A-or (a). Virus de la stomatite vésiculeuse sur cellules Vero (b): localisation double en utilisant successivement sur chacune des faces de la coupe des sérums polyclonaux de lapin anti-N (flèche grasse) et anti-S (flèche mince) et la protéine A-Or de 15 et 8 nm respectivement. Fixation au glutaraldéhyde 1% et enrobage à l'Araldite 502 (Échelle = 0.5 µm).

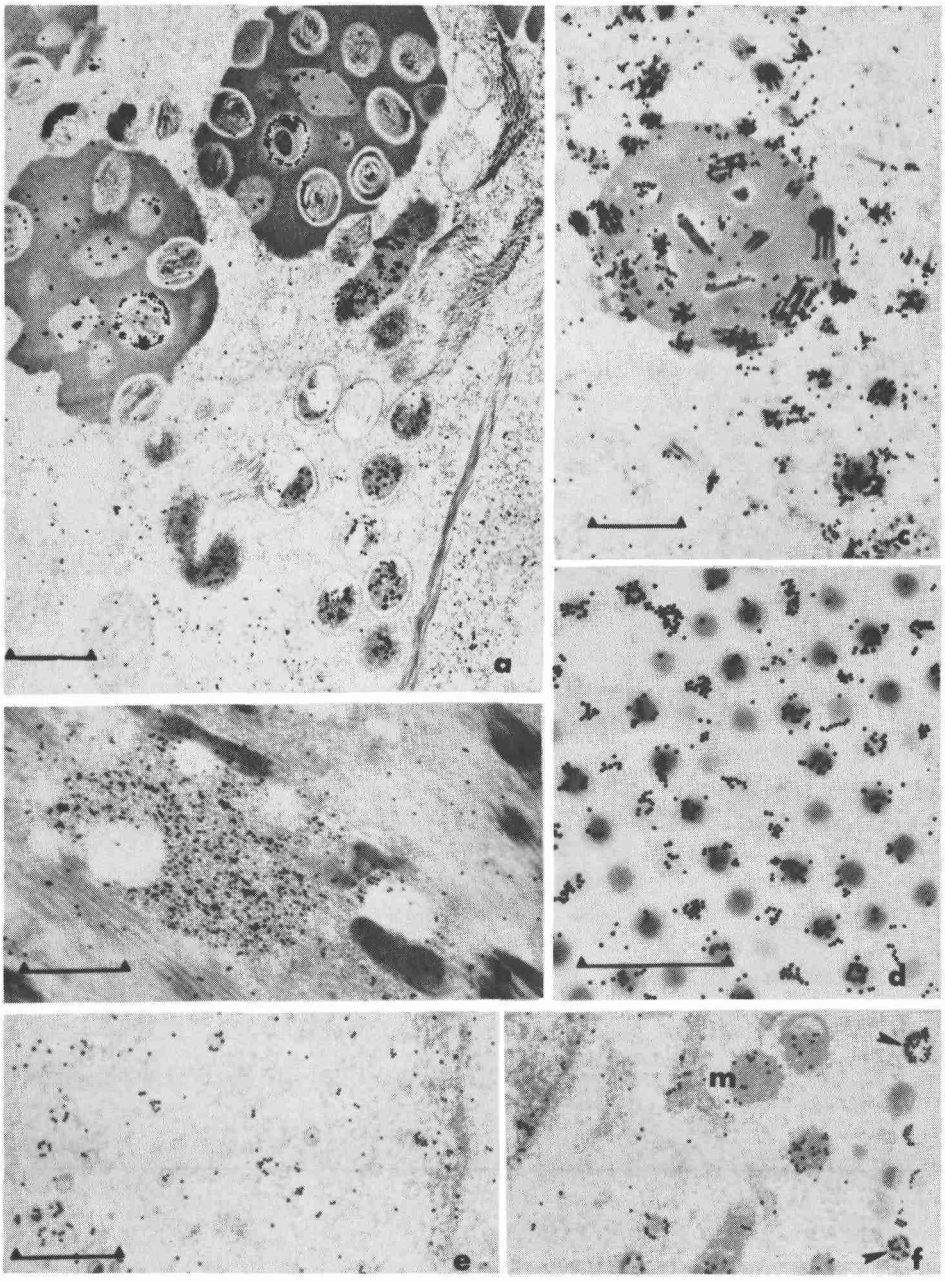


**Figure 4**

**Localisation et caractérisation des acides nucléiques par la technique enzyme-or**

Localisation de l'ARN du virus entomopox de *Christoneura fumiferana* démontrant la présence d'ARN chez ce virus à ADN (a) et du virus Nodamura de *Galleria mellonella* (b) avec l'ARNase-or. Localisation avec de l'ADNase-Or de l'ADN du virus de la polyédrose nucléaire (VPN) (a), du virus irisant de *Tipula* (TIV) chez *Galleria mellonella* (d) et du virus *Herpes simplex* type I sur cellules HeLa (e: capsides intranucléaires; f: virions bourgeonnants). L'hétérochromatine et les mitochondries (m) sont aussi marquées lors de cette technique. Fixation au glutaraldéhyde 1% et enrobage à l'Araldite 502 (Échelle = 0.5 µm).

## 3. APPLICATION À LA LOCALISATION DES PROTÉINES ET DES ACIDES NUCLÉIQUES VIRAUX

La réalisation et le succès du marquage avec les complexes-or, en dehors de la qualité des complexes, vont dépendre principalement: (i) de la préservation de la structure cellulaire et de l'immobilisation, de la rétention et de la préservation de l'activité biologique de la macromolécule cible et selon le choix de la méthode de fixation et de déshydratation: (ii) de l'accessibilité de la macromolécule cible et des interactions électrostatiques qui sont fonction du choix de la méthode d'enrobage.

Généralement, ces exigences tendent à s'exclure mutuellement et des compromis devront être faits selon la macromolécule étudiée. Différentes approches sont disponibles aussi bien en microscopie optique qu'en microscopie électronique. Certaines méthodes comme l'ultracryotomie, le cryodécapage, la cryofracture ou la microscopie à balayage requièrent une expertise et un équipement qui font souvent défaut. Cependant, les méthodes conventionnelles avec certaines modifications permettent d'obtenir des résultats très satisfaisants.

En méthode directe, les séquences de marquage comprennent une incubation avec le complexe-or suivie de rinçages, alors qu'en méthodes indirectes, une première incubation avec l'anticorps primaire sera suivie de l'incubation avec l'anticorps secondaire-or. Les rinçages et les dilutions des complexes-or ou des anticorps primaires sont généralement effectués dans un tampon phosphate 100 mM pH 7.2–7.4, contenant 0.15 M de NaCl (PBS) ou, pour des pH près de 8, dans du tampon Tris–HCl 20 mM contenant 0.15 M de NaCl (TBS). Dans la méthode d'immuno–or, on ajoute au tampon, de l'albumine sérique bovine (1%), de l'ovalbumine (1%), du sérum normal (1 à 5%, décomplémenté par chauffage 30 min à 56°C) provenant de l'espèce animale qui fournit l'anticorps secondaire couplé à l'or , du Tween 20 (0.05%), du Triton X–100 (0.1%) ou de la gélatine (3%). Ces additifs servent d'agents bloquants des groupements libres non spécifiques et/ou d'agents mouillants. L'addition d'azoture de sodium ($NaN_3$) à des concentrations de 0.2 à 0.02% permet de limiter l'internalisation des complexes-or en méthode de préenrobage, et d'empêcher la contamination bactérienne. Aucun de ces additifs n'est recommandé lors de l'utilisation des enzymes–or ou des lectines–or. De plus, dans ces systèmes, le pH du tampon doit être ajusté au pH d'activité de chaque macromolécule. Finalement les conditions de dilution doivent être déterminées pour chaque protéine testée de manière à limiter le bruit de fond tout en maintenant un marquage spécifique intense.

Des témoins doivent démontrer, la spécificité des réactifs utilisés et, l'absence d'adsorption non spécifique de ces réactifs. Des concentrations élevées de réactifs et la présence de certains additifs peuvent contribuer à une telle adsorption non spécifique. Les détergents non ioniques, tel que le Tween 20 couramment utilisé pour rendre les coupes hydrophiles, réduisent efficacement le bruit de fond, à condition cependant que les coupes soient déposées sur des grilles nues de nickel. La présence d'un film support entraîne, en présence de Tween, une adsorption non spécifique très élevée. Les détergents cationiques ou anioniques et la présence d'impuretés dans certains lots d'albumine sérique bovine, qui modifie les charges électrostatiques ou neutralise les sites réactionnels, provoquent un marquage non spécifique. Avec les anticorps

monoclonaux, il est préférable d'utiliser de l'albumine sérique bovine ou de l'ovalbumine plutôt que le Tween qui modifie les charges de plusieurs anticorps monoclonaux.

### 3.1. APPLICATION DE L'OR COLLOÏDAL AUX MÉTHODES D'IMMUNO-EMPREINTE

L'utilisation de l'immuno-dot et l'immuno-empreinte en combinaison avec l'or colloïdal comme marqueur apparaît être une méthode très sensible pour la détection de complexes antigène-anticorps. Ces méthodes permettent de détecter et d'identifier des antigènes viraux immobilisés sur papier de nitrocellulose ou encore de caractériser des anticorps monoclonaux (AcM) dirigés contre les protéines virales.

1. Une fois les filtres de nitrocellulose imprégnés des différentes dilutions de l'antigène, ou après le transfert sur une bande de nitrocellulose des protéines séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Cuire ces filtres pendant 1 h à 80°C dans un four sous vide pour stabiliser l'imprégnation.

2. Plonger les filtres dans du PBS contenant 5% de sérum normal (de l'espèce animale chez laquelle est produit l'anticorps secondaire) ou 0.5% d'ASB et 0.05% de Tween 20, de façon à bloquer les liaisons non spécifiques.

3. Après 30 min, les incuber toute la nuit à 4°C ou 1 h à la température de la pièce avec l'antisérum ou l'AcM dilué dans le PBS-Tween puis rincer 4 fois 5 min au PBS-Tween.

4. Plonger les filtres pendant 1 h dans l'anti–IgG–or ou la protéine A-or dilué dans le même tampon. Après un dernier rinçage au PBS, on effectue la lecture. La réaction positive se reconnaît par une tache rose. Cette réaction positive peut être intensifiée avec un révélateur à l'argent (voir section 3.2.1).

### 3.2. APPLICATION DE L'OR COLLOÏDAL EN MICROSCOPIE OPTIQUE

Les complexes-or peuvent être appliqués directement sur des coupes à la paraffine ou sur coupes semi-fines de résine. L'or présente, une couleur rouge en lumière transmise et, en concentration suffisante, il est visualisé directement au microscope optique. À concentration submicroscopique, les traces invisibles d'or peuvent être intensifiées par une réaction photochimique à l'argent ou par des procédés photographiques.

Le traitement des coupes, préalablement au marquage, par des enzymes protéolytiques (protéase VII, trypsine ou pepsine) peut parfois permettre une intensification du marquage, en augmentant l'accessibilité des protéines aux complexes ou en libérant l'activité biologique des protéines cibles. Une autre façon d'intensifier le marquage serait d'augmenter le nombre d'étapes intermédiaires (méthode du sandwich) soit Ac primaire-Ac secondaire-Protéine A-or ou Ac tertiaire-or, ou Ac primaire-Ac secondaire biotinylé-Streptavidine-or, ou encore Ac primaire biotinylé-anti-biotine-Protéine A-or.

Finalement, la couleur caractéristique obtenue par cette méthode jumelée avec d'autres méthodes immunocytochimiques permettent la localisation simultanée de plusieurs protéines ou groupements hydrates de carbone dans une même cellule ou un même tissu.

### 3.2.1. Marquage des cellules avant fixation

Avant la fixation, incuber les cellules avec l'anticorps primaire dirigé contre l'antigène de surface et ensuite avec l'anticorps secondaire couplé à l'or. Ce marquage s'effectue stérilement avec des cellules en suspension ou encore avec des cellules adsorbées sur lames de microscope recouvertes d'un film de poly-L–lysine de masse moléculaire entre 150 000 et 300 000. L'adhérence des cellules sur film, de poly–L–lysine évite les cycles de centrifugation répétés, et n'affecte pas le marquage. Si une intensification à l'argent est nécessaire, on doit éviter la poly–L–lysine qui peut entraîner la formation de précipités.

1. Rincer les cellules avec la solution tampon PBS-ASB-Sérum normal 5% $-NaN_3$ pH 7.2.

2. Incuber pendant 30 min à la température de la pièce 25 µL de cellules **(minimum $10^6$ cellules) et 25 µL de la dilution de l'anticorps primaire.**

3. Rincer 3 fois avec le tampon PBS-ASB-$NaN_3$ par des cycles répétés de centrifugation et de resuspension.

4. Ajouter 25 µL de protéine A–or diluée dans le PBS-ASB-$NaN_3$ ou d'anticorps secondaires-or dilué dans du TBS-ASB-$NaN_3$ pH 8.2 et incuber 60 min à la température de la pièce.

5. Rincer 3 fois 5 min, au PBS-ASB ou TBS-ASB. Fixer les cellules pendant 2 min avec du formaldéhyde à 4% dans de l'alcool absolu, les rincer à l'eau distillée et les transférer dans du tampon citrate 0.01 M pH 4.

6. Intensifier à l'argent ou avec une émulsion photographique (NTB–2 de Kodak).

Pour une intensification à l'argent le réactif est le suivant: tampon citrate 85 mL, pH 3.5, 0.85 g d'hydroquinone. Immédiatement avant usage, ajouter 15 mL d'une solution fraîchement préparée de lactate d'argent ou de nitrate d'argent (0.11 g/ 15 mL). Protéger le mélange de la lumière. La réaction s'effectue dans le noir (ou sous un éclairage rouge) avec le réactif à l'argent, pendant 2 à 6 min.

Une autre solution consiste à recouvrir les cellules, fixées sur une lame de verre, d'une émulsion photographique liquide (NTB–2 de Kodak), puis de refroidir les lames à 0°C sur de la glace pendant 10 min. Rincer les cellules à l'eau courante, puis les déshydrater et les monter entre lame et lamelle.

### 3.2.2. Localisation sur coupes

Les coupes, exception faite des coupes à congélation ou des coupes de tissus enrobées au Lowicryl, qui sont colorées directement, doivent subir un prétraitement pour retirer le milieu d'enrobage.

1. Déparaffiner les coupes histologiques au xylène et les réhydrater graduellement à l'alcool jusqu'à l'eau; puis, les transférer dans un tampon approprié avant le marquage. Pour les coupes semi-fines de spécimens enrobés dans les résines Epon ou Araldite, les traiter de 2 à 5 min avec un mélange fraîchement préparé et filtré, composé de 2 g de NaOH, de 10 mL de méthanol absolu et de 5 mL de propylène oxyde.

2. Rincer ensuite les coupes dans du PBS-méthanol (1:1) puis au PBS. Rincer les coupes au PBS-ASB 0.1%-Tween 0.05% et Triton 0.1%, (deux bains de 5 min). Incuber avec du sérum normal pendant 10 min.

3. Drainer l'excès et incuber avec une dilution appropriée de l'anticorps primaire pendant 90 min. Utiliser le tampon PBS-ASB-Tween-Triton pour la dilution.

4. Rincer 3 fois 5-10 min avec le même tampon, avant d'incuber les coupes pendant 1 h en présence de l'anticorps secondaire-or ou de la protéine A-or dilué dans le PBS-ASB à une densité optique de 1.85 à 525 nm.

5. Rincer 3 fois au tampon. puis plusieurs fois à l'eau distillée.

6. Intensifier à l'argent (section 3.2.1) ou déshydrater rapidement les coupes et les monter entre lame et lamelle, avec ou sans coloration. Les structures marquées apparaissent rouge clair ou rouge foncé selon la densité du marquage et après intensification elles apparaissent brun-noir.

## 3.3. COLORATION DE DÉCORATION IMMUNONÉGATIVE EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

La détection et l'identification de virus par coloration négative ou par immuno-électro-microscopie à partir d'extraits de plantes, de spécimens cliniques ou de surnageants de culture, présentent des difficultés dues à la présence de matériel contaminant non viral. Dans certains cas, le virus perd son intégrité structurale. Les méthodes de décoration à l'or favorisent la détection des virus peu identifiables.

Ces méthodes de décoration immunonégative permettent:

- d'identifier et de typer les virus animaux ou les virus de plantes
- de localiser et de visualiser la distribution et l'organisation des protéines virales de surface
- de caractériser les anticorps et particulièrement les Ac monoclonaux dirigés contre des épitopes des protéines de surface

### 3.3.1. Immunomarquage des virus directement sur grille

Le virus est adsorbé sur une grille recouverte d'un film de parlodion ou de formvar-carbone laquelle est soumise aux étapes successives de marquage décrites précédemment, et de coloration à l'acide phosphotungstique à 2%, pH 6.5 ou à l'acétate d'uranyle à 2%. Cette méthode exige un titre assez élevé de virus. Voir l'exemple à la Figure 1.

On propose comme variante de faire adsorber au préalable, sur la surface du film support de la grille, un anticorps spécifique au virus mais produit chez une autre espèce animale que celle qui fournit l'anticorps secondaire utilisé dans la méthode d'immunomarquage. Cette variante permet de capter spécifiquement les virus sur la grille et augmente l'efficacité de captage, surtout pour l'examen d'échantillons à faible concentration de virus. Le bruit de fond peut être diminué en ajoutant dans les solutions de dilution et de rinçage du ASB à 1%, de la gélatine à 3% ou du Tween 20 à 0.05%, si le virus est non enveloppé. Une préfixation légère au paraformaldehyde-glutaraldéhyde peut être nécessaire à la préservation de la structure de certains virus.

#### 3.3.1.1. Exemple: Immunomarquage du virus influenza B humain

1. Faire flotter la grille recouverte d'un film support formvar ou collodion-carbone déionisé sur une goutte de **sérum de lapin** anti-influenza B humain dilué (déterminer la dilution optimale) ou dans du tampon PBS pendant 20 min à la température de la pièce.

2. Transférer pour quelques minutes la grille sur une goutte de la suspension du virus Influenza B (surnageant de milieu de culture ou expectorat) déposée sur une plaque d'agar à 2%.

3. Rincer sur 2 gouttes de tampon PBS-ASB à 1% ou de gélatine à 3%.

4. Transférer sur le **sérum humain** anti-influenza B dilué (à déterminer expérimentalement la dilution pour chaque sérum de référence) dans le PBS-ASB ou PBS-gélatine pendant **3 min. Des temps prolongés d'incubation n'améliorent pas l'intensité du** marquage mais, peuvent par contre augmenter le bruit de fond.

5. Rincer rapidement sur 6 gouttes de PBS-ASB ou gélatine.

6. Faire flotter la grille sur 1 goutte de sérum de chèvre anti–IgG-humain couplé à l'or ou de protéine A-or dilué dans le même tampon.

7. Rincer sur 6 gouttes de PBS puis sur 2 gouttes d'eau bidistillée et colorer au phosphotungstate ou à l'acétate d'uranyle.

Lorsque la protéine A-or est utilisée, il est possible, après l'incubation avec l'anticorps primaire, de traiter la grille pendant 60 min sur un mélange de sérum humain anti Influenza B et de protéine A–or (aux dilutions optimales à déterminer) incubé au préalable 30 min à 37°C. L'utilisation d'anticorps monoclonaux directement couplés à l'or pourrait abréger ces étapes.

Certains préfèrent une coloration à l'acétate d'uranyle dans l'alcool qui colore principalement les ribonucléoprotéines et contraste peu la structure du virus. Elle donne une meilleure résolution avec un bruit de fond faible. Cette méthode a permis de démontrer la répartition uniforme des hémagglutinines (HA) et la répartition en groupes des neuraminidases (NA) sur l'enveloppe du virus influenza, et une répartition uniforme des hémagglutinines-neuraminidases (HN) et des protéines de fusion (F) sur l'enveloppe du virus Sendai. Pour ce virus une préfixation s'avère nécessaire. Pour la coloration à l'acétate d'uranyle alcoolique, plonger la grille dans de l'alcool 50% pendant 10 sec, puis la transférer 30 sec dans un mélange (1:3) d'acétate d'uranyle 2%, et d'alcool éthylique 100%, ensuite la rincer à l'alcool à 95% et sécher.

Cette méthode de décoration a permis la localisation et la distribution des protéines NS et L du virus de la stomatite vésiculeuse, directement sur les complexes ribonucléoprotéines (RNP) isolés. Les RNPs, diluées dans un tampon HEPES 20 mM pH 7.4 contenant 2 mM d'EDTA pour empêcher le surenroulement des RNPs, sont adsorbées directement sur grille collodion-carbone pendant 15 min avant d'être soumis à l'immunomarquage.

#### 3.3.1.2. Exemple: Immunomarquage de cellules cultivées directement sur grille

Cette méthode permet l'étude des relations des virus avec le cytosquelette ainsi que l'analyse structurale et l'identification des virus, et cela sans étape préalable de

purification ou de concentration qui peuvent altérer la morphologie virale. Les virus produits et libérés par les cellules infectées, cultivées directement sur des grilles parlodion-carbone, adhèrent à la surface du film support des grilles et peuvent être colorés au KPT ou décorés avec les méthodes à l'or.

**Préparation des grilles en or recouvertes d'un film parlodion-carbone**

Les grilles en or de 200 mesh sont lavées au $HNO_3$, à l'acétone puis à l'eau distillée. Elles sont recouvertes de parlodion et de carbone puis irradiées aux UV (360 nm) pendant 10 min. Elles sont rendues hydrophiles par un traitement au Nonidet P–40 à 0.1% dans du PBS pH 7.4 ou du milieu de culture, puis rincées plusieurs fois au tampon phosphate ou au milieu de culture. Il ne faut pas assécher les grilles, ni après le rinçage, ni lors du transfert de celles-ci dans le Petri de culture stérile où les cellules sont mises en culture.

**Immunomarquage**

Lorsque l'infection est assez avancée, les grilles sont récupérées, rincées dans du PBS stérile et fixées légèrement au glutaraldéhyde à 0.05% ou 0.1% pendant 3 min avant d'être soumises à la séquence de l'immunomarquage. Les grilles peuvent être post-fixées au glutaraldéhyde et à l'osmium avant la coloration au KPT ou encore avant un traitement par la méthode du point critique.

### 3.3.2. Immunomarquage des virus en suspension

La méthode d'immunomarquage en suspension donne un faible bruit de fond, tout en augmentant la sensibilité de la détection de l'antigène et est décrite comme la méthode la plus sensible des immunoessais. L'excès d'anticorps provoque un bruit de fond élevé et on doit déterminer une dilution optimale pour chaque sérum. Les complexes-or sont standardisés à une densité optique de 0.2 à 525 nm.

**Méthode 1**

1. Placer dans un puits d'une microplaque 25 µL de la suspension virale et 25 µL du sérum immun spécifique dilué dans du tampon PBS-ASB-$NaN_3$.

2. Incuber 45 min à 37°C en chambre humide. Ajouter 25 µL de protéine A-or et incuber de nouveau 45 min à 37°C.

3. Transférer 50 µL du mélange sur une grille formvar-carbone placée sur une plaque d'agar à 1%. Laisser diffuser la goutte 30 min à la température de la pièce. Ne pas laisser sécher.

4. Laver la grille par immersion successive dans 2 gouttes de tampon, puis 2 gouttes d'eau bidistillée et colorer au KPT 1% pH 7.2.

**Méthode 2**

1. Le virus *Herpes simplex* concentré par ultracentrifugation à 48 000 x g pendant 90 min est resuspendu dans du PBS (300 µL/mL de milieu de culture centrifugé).

2. Ajouter 20 à 30 µL des différents AcM-or et bien mélanger. Incuber le mélange toute la nuit à la température de la pièce, puis diluer à 5 mL avec du PBS et centrifuger à 27 000 x *g* pendant 20 min.

3. Resuspendre le culot est dans quelques gouttes de KPT 1% pH 6.2

et déposer une goutte sur une grille formvar-carbone. Drainer l'excès de liquide avec un papier filtre.

En couplant chaque anticorps monoclonal à des particules d'or de diamètres différents, il devient possible d'examiner la localisation et la distribution simultanées de deux glycoprotéines de surface.

## 3.4. LOCALISATION PAR LA MÉTHODE DE PRÉ-ENROBAGE

La méthode de pré-enrobage permet la localisation de macromolécules sensibles aux fixateurs comme c'est le cas pour de nombreux récepteurs de surface des membranes cytoplasmiques ou certaines glycoprotéines virales. Le marquage est effectué sur cellules ou sur des coupes épaisses à congélation de 20 à 100 nm, non fixées ou après une légère fixation au paraformaldéhyde. Les tampons ou milieux de culture utilisés doivent être isotoniques pour les cellules. Après le marquage, les cellules sont postfixées au glutaraldéhyde puis à l'acide osmique ($OsO_4$) et enrobées dans les résines par les méthodes conventionnelles. Cette technique donne un bon contraste, une excellente préservation de l'ultrastructure ainsi qu'une bonne localisation des macromolécules situées à la surface des membranes cytoplasmiques. En effet, la pénétration des complexes-or à l'intérieur des cellules étant limitée, l'emploi de particules d'or de très petite taille (2 à 3 nm) ou la perméabilisation des membranes par des détergents, Triton X–100, Saponine ou digitonine, devienne alors nécessaires pour la localisation des protéines intracellulaires. Mais, cette perméabilisation, qui parfois démasque certains antigènes, altère généralement l'ultrastructure et peut entraîner la migration des protéines ou une infiltration incomplète des complexes jusqu'aux différents compartiments cellulaires.

**Méthode de marquage des cellules en suspension**

1. Ajouter 5 µL d'anticorps primaire à 100 µL de cellules ($10^7$ cellules/mL) resuspendues dans du tampon PBS-ASB-$NaN_3$. S'il s'agit de lymphocytes humains, ajouter au tampon 1% de sérum humain AB inactivé à la chaleur pour saturer les sites récepteurs des cellules pour le fragment Fc des immunoglobulines.

2. Incuber 30 à 60 min en agitant toutes les 10 min. Rincer avec le tampon 3 fois 5 min par des cycles répétés de centrifugation et de resuspension des cellules.

3. Incuber 30 min avec 25 µL d'anticorps secondaire-or ou de protéine A-or dilué dans du PBS-SAB-$NaN_3$ pH 7.2. La dilution optimale doit être déterminée expérimentalement.

4. Rincer plusieurs fois avec le tampon.

5. Fixer pendant 30 min au glutaraldéhyde 2% dans du tampon cacodylate 0.1 M pH 7.2.

6. Rincer au tampon cacodylate et postfixer pendant 20 min à l'$OsO_4$ à 2% dans le même tampon.

7. Laver et colorer en bloc à l'acétate d'uranyle. Déshydrater et enrober dans une résine.

Certains auteurs fixent brièvement avant immuno-marquage les cellules au glutaraldéhyde à 0.25% dans du PBS et effectuent les rinçages et les dilutions des anticorps dans le PBS additionné de 10 mM de monohydrochlorure de lysine pour le blocage des groupements aldéhydes libres.

**Méthode de marquage de tapis monocellulaires**

Les cellules cultivées dans des plats de Petri résistants à l'acétone et aux époxy, sont traitées et enrobées directement à plat. Autrement, après immunomarquage, les cellules sont grattées et reprises dans de l'agar à 2% avant la déshydratation et l'enrobage en capsule.

## 3.5. LOCALISATION PAR LA MÉTHODE DE POSTENROBAGE

La localisation des macromolécules s'effectuant sur coupes ultrafines, tout antigène membranaire ou intracellulaire exposé à la surface de la coupe devient accessible aux réactifs. Ces méthodes qui permettent une bonne préservation de l'ultrastructure et une accessibilité directe des macromolécules cibles, offrent la possibilité de localisation simultanée de différentes macromolécules sur la même coupe. L'augmentation de la sensibilité et l'utilisation de faible volume de réactifs à des dilutions souvent élevées constituent d'autres avantages. Les témoins sont effectués sur des coupes sériées et permettent donc une bonne corrélation.

Les facteurs limitants dans les méthodes de post-enrobage découlent du mode de préparation des spécimens, i.e. de la fixation, de la déshydration et de l'enrobage.

### 3.5.1. Préparation des spécimens

#### 3.5.1.1. Fixation

Les conditions optimales de fixation doivent être soigneusement déterminées pour chaque système de manière à combiner une bonne ultrastructure et un marquage intense. La majorité des bons fixateurs font intervenir des liaisons inter et intramoléculaires ("cross-link") qui modifient la configuration moléculaire et diminuent l'activité biologique des macromolécules. Par ailleurs, une faible fixation peut favoriser l'extraction des macromolécules restées solubles.

La post-fixation à l'acide osmique ($OsO_4$) est à éviter sauf pour certaines molécules très résistantes à l'$OsO_4$, ou des molécules qui sont présentes à des concentrations telles que certains sites non affectés par l'$OsO_4$ restent réactionnels (i.e., les parois de bactéries ou de champignons). Dans certains cas l'activité des molécules doit être restaurée par réoxydation des coupes pendant 30 à 60 min dans une solution aqueuse saturée de sodium métaperiodate (Bendayan et Zollinger 1983).

Le glutaraldéhyde reste le fixateur de choix mais, doit être utilisé aux concentrations les plus faibles possibles, entre 0.1% et 3%. Si l'antigène est sensible, même à de faible concentration de glutaraldéhyde, le formaldéhyde (fraîchement préparée à partir de paraformaldéhyde) peut être utilisée jusqu'à des concentrations de 8%. Des combinaisons paraformaldéhyde-glutaraldéhyde peuvent s'avérer plus efficaces, la glutaraldéhyde à faible concentration 0.05 à 0.1% permettant de stabiliser les structures. Enfin, toujours dans un souci d'améliorer la structure et/ou l'intensité du marquage, des additifs aux fixateurs tels que l'acroléine à 1%, l'acide picrique ou l'acide tannique à 2% ont été suggérés pour favoriser la rétention de certaines macromolécules. D'autres additifs comme le polyvinyl pyrrolidone, PVP–10 de 5 à 10% ou l'éthyl acétimidate améliorent l'immunomarquage. La composition du fixateur (type et concentration du fixateur, le tampon et les additifs) peut être déterminée expérimentalement en microscopie optique ou en "immunodot" pour chaque macromolécule .

### 3.5.1.2. Enrobage

Différentes résines sont disponibles. Les polyesters et les époxy présentent une forte réactivité et sont de nature hydrophobe, et donc imperméables. Pour les rendre plus hydrophiles il est possible d'ajouter à la résine du sodium méthoxyde ou éthoxyde. Un autre moyen consiste à décaper les coupes fines par un traitement au peroxyde d'hydrogène à 10% ou à l'acide periodique à 1% pendant 10 à 30 min. Une hydrolyse partielle peut aussi être pratiquée à l'aide d'une solution à 1% de sodium hydroxyde alcoolique pendant 30 sec suivie de rinçages à l'alcool à 100% puis à 50%. Par contre, bon nombre de macromolécules et les sites récepteurs des lectines ou les protéines du cytosquelette, en particulier, sont peu préservées par l'enrobage à l'Epon ou à l'Araldite. D'autre part, beaucoup d'anticorps monoclonaux ont du mal à identifier leurs épitopes homologues à la surface de coupes d'époxy.

Les méthacrylates apparaissent supérieurs aux époxy. D'abord ces résines sont hydrophiles et de plus, la déshydratation aux solvants organiques, responsables de dénaturation et d'extraction. Par contre, les méthacrylates ont tendance à se rétracter au cours de la polymérisation, entraînant une moins bonne préservation de l'ultrastructure.

Une nouvelle génération de résines, des acryliques, pourraient permettre une nette amélioration en immunocytochimie. Les résines L.R. White avec polymérisation à chaud ou le L.R. Gold avec polymérisation à froid sous UV (–20°C) donnent des résultats satisfaisants. Un autre acrylique hydrophile, le Lowicryl K4M avec une déshydratation à –20°C et une polymérisation à –35°C sous lampe UV permet une meilleure préservation à la fois de l'ultrastructure et de l'activité biologique des macromolécules, malgré des fixations légères. Avec cette résine, le bruit de fond reste très faible. Le Lowicryl constitue la résine de choix pour la localisation des sites de fixation des lectines et de plusieurs autres macromolécules sensibles aux époxy, dont les protéines du cytosquelette.

Finalement, techniquement plus délicates, les méthodes d'ultracryotomie qui permettent une meilleure accessibilité des structures cellulaires aux réactifs, lorsque combinées, après le marquage, avec un enrobage dans les résines conventionnelles, donnent des résultats très similaires à ceux obtenus en méthode de pré-enrobage tout en localisant les macromolécules intra-cellulaires.

## 3.5.2. Méthode d'immuno-or colloïdal

### 3.5.2.1. Modèle de fixation

1. Fixer les tissus ou les cellules pendant 20 min à 2 h à la température de la pièce avec un mélange de paraformaldéhyde 3% et de glutaraldéhyde 0.1% dans du PBS ou dans du milieu balancé de Hanks. Ajouter au fixateur 4% de polyvinyl pyrrolidone (30 000) et 70 mM de $NaNO_2$.

2. Rincer les spécimens dans le même tampon, 2 fois 15 min, puis dans une solution de 50 mM de $NH_4Cl$ pour bloquer les groupements aldéhydes libres, pendant 30 à 60 min.

3. Rincer toute la nuit dans le tampon phosphate.

4. Déshydrater et enrober dans la résine choisie.

5. Préparer des coupes ultrafines sur grilles de nickel nues ou recouvertes d'un film support formvar-carbone.

### 3.5.2.2. Immunomarquage

La coloration est pratiquée sur des gouttes des différents réactifs placées sur du Parafilm™ ou à l'intérieur de puits d'une microplaque. Il ne faut pas assécher les grilles entre les différentes étapes, et toutes les solutions doivent être filtrées 0.22 µm ou centrifugées.

1. Prétraiter, si nécessaire, les coupes à l'acide periodique 1% ou au peroxyde d'hydrogène à 10% pendant 10 à 30 min. L'hydrolyse par des enzymes protéolytiques peut s'avérer utile pour démasquer certains antigènes.

2. Rincer plusieurs fois à l'eau distillée avant les étapes d'immunomarquage.

3. Faire flotter les coupes pendant 5 min sur une goutte de PBS-ASB ou PBS-ovalbumine 1% ou PBS-Tween 0.05%.

4. Transférer la grille sur 10 à 20 µL d'anticorps primaire dilué dans le même tampon et incuber 60 min à la température de la pièce.

5. Rincer sur plusieurs gouttes de PBS-Tween ou PBS-ASB pour une période de 20 min.

4. Déposer la grille sur la protéine A-or ou sur l'anticorps secondaire-or, dilué dans du PBS ou du TBS et incuber pendant 60 min à la température de la pièce. **Le complexe-or n'est pas dilué en présence de Tween qui semble déstabiliser l'ensemble des *réactions*.**

7. Laver la grille avec le tampon d'abord sur des gouttes ensuite avec un flacon gicleur et finir le rinçage à l'eau bidistillée.

8. Colorer à l'acétate d'uranyle aqueux à 2% et au citrate de plomb. L'acétate de plomb de Millonig est recommandé pour les résines à base d'acrylique.

Certains ajoutent du sérum normal (1 à 5%) de l'espèce animale fournissant l'anticorps secondaire, aux tampons de rinçage et de dilution, et recommandent de travailler à pH 8 avec les immunoglobulines-or. Selon le diamètre des particules d'or, les dilutions sont standardisées au spectrophotomètre à une absorbance de 0.44 à 525 nm pour la protéine A-or 14 nm et de 0.06 pour celle de 10 nm.

Pour le **marquage double**, employer l'une des trois méthodes suivantes:

A) Effectuer la coloration en séquence avec chaque système anticorps primaire-complexe-or homologue en veillant à bloquer les sites non spécifiques entre chaque système. Ill s'agit d'incuber les coupes après le premier marquage avec un excès de protéine A (50 µg/mL) non marquée ou d'immunoglobulines non marquées de la même espèce animale que celle des immunoglobulines utilisées dans le deuxième système.

B) Appliquer simultanément les deux Ac primaires produits chez deux espèces animales différentes. Après les étapes d'incubation et de rinçage, faire réagir un mélange correspondant de deux anticorps secondaires homologues couplés à des particules d'or de diamètres différents.

C) Marquer séparément et alternativement chaque face des coupes placées sur grille nue, avec chacun des systèmes anticorps primaires-anti-

corps secondaire ou la protéine A couplée à l'or d'un diamètre particulier (Figure 3b).

### 3.5.2.3. Enzyme-or

1. Déposer pendant 5 min les coupes montées sur grille nickel sur du PBS à pH 6 pour l'ADNase-or ou à pH 7.5 pour l'ARNase-or.

2. Transférer les grilles sur le complexe nucléase-or, dilué dans le PBS au pH d'activité de la nucléase, pendant 30 min à la température de la pièce.

3. Rincer au PBS puis à l'eau distillée et colorer. Le rinçage peut être critique; s'il est trop prolongé, les complexes-or peuvent décrocher.

Les contrôles de spécificité incluent le prétraitement des coupes par les nucléases non marquées ou la neutralisation de l'activité nucléase par son substrat (ADN ou ARN à raison de 1 mg/mL) avant le marquage (Figure 4).

### 3.5.2.4. Lectine-or

**Méthode directe**

1. Placer les grilles sur du PBS pendant 5 min.

2. Incuber avec différentes concentrations de la lectine-or diluée dans du PBS **au pH optimal pour chaque lectine.**

3. Rincer 3 fois au PBS pendant 2 à 3 min.

4. Une fixation à la glutaraldéhyde 2.5% dans le PBS pendant 5 à 10 min, prévient le décollement des complexes qui pourrait se produire à cause des grandes variations de pH au cours de la coloration à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb.

5. Rincer de nouveau au PBS, laver à l'eau bidistillée et contraster les coupes.

**Méthode indirecte.**

1. Incuber les coupes sur différentes concentrations (2.5 à 250 µg/mL) de concanavaline-A (ConA) ou de l'agglutinine de germe de blé (WGA) pendant 30 min, puis rincer 2 fois au PBS au pH optimal.

2. Placer les coupes sur différentes concentrations des complexes peroxydase-or (2.5 à 50 µg/mL) pour la ConA, ou ovomucoïde-or pour la WGA et incuber 30 min à la température de la pièce.

3. Rincer et procéder tel que décrit précédemment.

   **Les contrôles de spécificité doivent** comprendre:

   (i) une préincubation de la lectine-or avec le sucre ou le glycopeptide bloquant,

   (ii) une préincubation des coupes avec la lectine non couplée,

   (iii) un traitement des coupes par des glycosidases, des protéases ou d'autres réactifs tel que l'acide periodique qui neutralisent l'activité du groupement hydrate de carbone visé.

### 3.5.2.5. Streptavidine-or

Dans cette méthode, les anticorps primaires ou les lectines sont biotinylés. Après incubation des coupes avec les macro-

molécules biotinylées, à la bonne dilution dans le tampon requis, celles-ci sont transférées sur de la streptavidine-or dilué dans du PBS. Pour obtenir de bons résultats utiliser plutôt l'anticorps primaire, puis un anticorps secondaire biotinylé, et ensuite la streptavidine-or. Les contrôles doivent démontrer l'absence de biotine endogène.

### 3.5.2.6. Hybridation *in situ*

La localisation de séquences d'acides nucléiques par hybridation *in situ* constitue une approche importante dans le diagnostic. Le développement des méthodes de couplage des sondes d'ADN ou d'ARN à la biotine, plutôt qu'à des radioisotopes, ouvre la voie à une méthode d'hybridation *in situ*, rapide, de grande affinité et plus spécifique que les méthodes d'hybridation par autoradiographie. De plus, les sondes liées à la biotine se conservent longtemps et ne présentent pas de risque de manipulation.

La localisation d'acides nucléiques bicaténaire et en particulier des ADN viraux a été réalisée avec des sondes biotinylées en microscopie optique sur coupes à la paraffine ou sur frottis cellulaires à l'aide de l'immunoperoxydase ou de l'immunofluorescence, et rien n'interdit l'application de l'immuno-or. Dans cette méthode, les acides nucléiques bicaténaires doivent être dénaturés pour séparer les deux brins et permettre une hybridation d'un des brins avec la sonde biotinylée complémentaire. Cette dénaturation constitue la difficulté majeure à l'adaptation de cette méthode *in situ* en microscopie électronique pour la localisation de segments d'ADN intimement imbriqués dans les résines d'enrobages. Par contre, elle est réalisable sur des chromosomes isolés et montés sur grilles, après dénaturation de l'ADN soit dans un tampon à pH ajusté à 12 ou 13 avec du NaOH 1 N ou dans une solution tamponnée de formamide à 70%. Les acides nucléiques monocaténaires sont, pour leur part, directement accessibles sur coupes.

#### 3.5.2.6.1. Hybridation *in situ* en microscopie optique

**Prétraitement**

1. Déparaffiner les coupes histologiques qui ont été placées la veille à 60°C, puis les réhydrater et les sécher. Les frottis de cellules sont fixés au Carnoy ou à l'acétone.

2. Hydrolyser les coupes ou frottis avec du HCl 0.1 N pendant 20 min, les rincer 6 min dans un tampon 2X SSC (NaCl 0.3 M, citrate de sodium 0.03 M, pH 7) et les traiter à la protéinase K, 50 µg/mL dans du TBS pH 7.4 $CaCl_2$ 2 mM, pendant 15 min à 37°C.

3. Rincer les coupes 4 fois 3 min avec du PBS renfermant 0.2% de glycine (p/v) puis les plonger dans du triéthanolamine 0.1 M ajusté à pH 8 avec du HCl 1 N contenant 5 mL/L d'acide acétique. Les rincer à l'eau distillée, puis les déshydrater à l'alcool et les sécher à l'air.

**Hybridation de l'ADN**

1. Hydrolyser l'ARN cellulaire par une digestion à l'ARNase A (100 µg/mL) et l'ARNase T1 (10 U/mL) dans un tampon 2X SSC-EDTA 0.001% et 5% de glycérol, pendant 30 min à 37°C.

2. Inactiver les ARNases par deux lavages de 5 min, sous agitation, dans du 2X SSC contenant 0.2% de diéthyl pyrocarbonate, puis rincer les coupes 2 fois 5 min dans le 2X SSC et les déshydrater.

3. Juste avant l'hybridation, fixer pendant 2 h l'ADN cellulaire à la paraformaldéhyde 5% dans du NaCl 0.3 M à pH 7, puis laver les coupes 2 fois à l'eau bidistillée et les déshydrater à l'alcool.

4. Pour compléter la dénaturation de l'ADN, placer les lames pendant 15 min dans une solution à 65°C contenant 95% de formamide fraîchement déionisée préparée dans du SSC 0.1X .

5. Recouvrir le spécimen de 20 µL de la solution d'hybridation constituée de 2 µg/mL de la sonde ADNc-biotinylée (dénaturée par chauffage à ébullition pendant 2 min suivie d'un refroidissement brusque sur un bain de glace), de 400 µg/mL d'ADN de sperme de hareng soumis aux ultrasons, de 50% de formamide, de 10% de sulfate de dextran , de 1% de ASB, de 0.02% de Ficoll, et de 0.02% de polyvinyl pyrrolidone (10 000), le tout mélangé, dans du tampon SSC 2X pH 7.

6. Déposer une lamelle par dessus, et la sceller.

7. Transférer les lames à 90°C pendant 6 min ou les soumettre à un jet de vapeur à 80°C pendant 10 min. Refroidir brusquement les lames sur de la glace, pour provoquer un choc thermique dénaturant pour l'ADN cellulaire et l'ADNc.

8. Laisser hybrider de 15 min à 50 h à 42°C, en chambre humide.

**Hybridation de l'ARN**

1. Recouvrir les coupes semi-fines des tissus enrobés au Lowicryl ou les coupes histologiques déparaffinées de 20 µL de la solution d'hybridation puis recouvrir d'une lamelle et sceller.

2. Laisser hybrider à 37°C pendant 5 à 10 h.

**Réaction avec la protéine A-or**

1. Après l'hybridation de l'ARN ou de l'ADN, retirer la lamelle et rincer les coupes au PBS 5 fois 5 min avant le marquage.

2. Incuber les lames 2 h à la température de la pièce, avec un anticorps anti-biotine dilué dans du PBS-ASB-Triton-Tween-$NaN_3$, et rincer au PBS 2 fois pendant 5 min (voir section 3.2.2).

3. Incuber les coupes pendant 1 h avec de la protéine A-or diluée dans le PBS .

4. Les rincer au PBS 2 fois 5 min et les incuber à nouveau 2 h avec un anticorps anti-protéine A dilué dans le même tampon. Rincer 2 fois 5 min au PBS, puis effectuer une dernière incubation de 1 h avec de la protéine A–or.

5. Rincer les coupes 2 fois 2 min au PBS puis 1 fois à l'eau distillée et les laisser sécher à l'air.

Une intensification à l'argent peut être pratiquée (voir section 3.2.1) ainsi qu'une contre-coloration de 20 sec au bleu de toluidine à 0.1% pour les coupes au Lowicryl, ou avec 0.5% de Fast Green ou à l'hématoxyline de Gill pour les coupes histologiques. Une solution consiste à incuber les coupes, après le sérum de lapin anti-biotine, avec un sérum de chèvre anti–IgG de lapin-biotinylé suivi de la streptavidine-or. Dans ce cas, du sérum normal de chèvre à 1% est ajouté dans le tampon de rinçage.

#### 3.5.2.6.2. Hybridation *in situ* en microscopie électronique pour les ARN

L'hybridation *in situ* n'a été appliquée en microscopie électronique que sur coupes de tissus enrobés au Lowicryl K4M. Les coupes de tissus fixés au paraformaldéhyde 4% et glutaraldéhyde 0.08% dans du PBS 0.1 M à pH 7.4 sont placées sur grilles–or recouvertes d'un film support formvar-carbone.

1. Chauffer les coupes 1 h à 60°C, puis les incuber entre 1 h à 48 h à 40°C avec le mélange d'hybridation.

2. Rincer les grilles 1 fois au formamide à 50% dans 2X SSC pendant 10 min, puis 3 fois 15 min dans du PBS et procéder à l'immunomarquage tel que décrit précédemment.

## 4. CONCLUSION

Les méthodes à l'or colloïdal décrites dans ce chapitre ne représentent qu'une introduction aux méthodes disponibles dans un laboratoire de microscopie électronique conventionnel, pour la localisation et l'identification des protéines et des acides nucléiques viraux ou pour la caractérisation des sondes d'ADN ou d'ARN et des anticorps monoclonaux. D'autres méthodes plus élaborées ou nécessitant de l'équipement particulier sont également utilisables.

La technique des répliques permet l'étude spécifique des surfaces des cellules ou des virus bourgeonnants. Les cellules fixées aux aldéhydes sont soumises à la séquence de marquage avant d'être postfixées à l'$OsO_4$. Elles sont ensuite déshydratées, séchées au point critique et une réplique est préparée par évaporation de carbone ou de platine-carbone. Cette technique a permis, entre autres, l'étude de la surface de plusieurs virus enveloppés, de leurs bourgeonnements sur les membranes et de leur relations avec le cytosquelette, en particulier pour le virus de la rougeole, le virus Maloney de la leucémie murine, ou le virus de l'immunodéficience acquise (HIV).

La technique de cryodécapage ou cryofracture en combinaison avec les complexes–or apporte aussi une importante contribution à l'étude du mode de bourgeonnement des virus sur les membranes ainsi qu'à la localisation de macromolécules intra membranaires. Il ne faudrait pas oublier de mentionner l'introduction de l'or en microscopie à balayage, qui apporte un complément précieux à l'étude de la surface cellulaire et du bourgeonnement des virus .

L'or colloïdal apparaît de plus en plus comme un marqueur polyvalent, universel et très sensible. Son application s'étend à tous les champs de la microscopie et de la biologie cellulaire. Les marqueurs à l'or sont facilement identifiables et grâce à une bonne préservation de la structure, la relation structure-réactifs devient précise. Ils peuvent être utilisés au marquage double et même triple de différentes macromolécules intra- ou extracellulaires, ou en combinaison avec les autres techniques immunocytochimiques. D'autre part, contrairement aux autres méthodes immunocytochimiques strictement qualitatives, l'or colloïdal permet d'effectuer des évaluations quantitatives.

L'avènement des anticorps monoclonaux, des sondes d'ADN ou d'ARN, et le développement du génie génétique, constituent de nouveaux champs d'exploration mais aussi de nouveaux outils pour le microscopiste, dans sa recherche de la caractérisation des cellules et de leur

mode de fonctionnement. La maîtrise d'un marqueur aussi polyvalent et flexible que l'or colloïdal devient alors un important atout à l'avancement de ces travaux. Ce n'est pas sans raison que l'or colloïdal est devenu le marqueur le plus important et le plus utilisé en immunocytochimie et en virologie.

*Mes sincères remerciements au docteur Moïse Bendayan, à Henry Strykowski et à Gisèle Amzallag pour leur contribution, ainsi qu'à Carole Arsenault et Annie Tremblay pour la dactylographie.*

## 5. RÉFÉRENCES

Beesley, J.E. 1986. The use of gold markers in immunocytochemical studies of microbiological organisms: a review. J. Microsc. 143: 177-186.

Bendayan, M. 1981. Ultrastructural localization of nucleic acids by the use of enzyme-gold complexes. J. Histochem. Cytochem. 29: 531-541.

Bendayan, M. 1982. Double immunocytochemical labelling applying the protein A-gold technique. J. Histochem. Cytochem. 30: 81-85.

Bendayan, M. 1984a. Protein–A-gold electron microscopic immunocytochemistry methods, applications and limitations. J. Electr. Microsc. Techn. 1: 243-270.

Bendayan, M. 1984b. Enzyme-gold electron microscopic cytochemistry: a new affinity approach for the ultrastructural localization of macromolecules. J. Elect. Microsc. Techn. 1: 349-372.

Bendayan, M. 1987. Introduction of the protein G-gold complex for high resolution immunocytochemistry. J. Electr. Microsc. Techn. 6: 7-14.

Bendayan, M. et Zollinger, M. 1983. Ultrastructural localization of antigenic sites on osmium-fixed tissues applying the protein A-gold technique. J. Histochem. Cytochem. 31: 101-109.

Bendayan, M. et Garzon, S. 1988. Protein-G-gold complex: comparative evaluation with the protein-A-gold for high resolution immunochemistry. J. Histochem. Cytochem. 36: 597-607.

Binder, M., Tourmente, S., Roth, J., Renaud, M. et Gehring, W.J. 1986. *In situ* hybridization at the electron microscope level: localization of transcript on ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A-gold complexes. J. Cell Biol. 102: 1646-1653.

Bullock, G.R. et Petrusz, P. 1982. *Techniques in immunocytochemistry*, Academic Press, N.Y., Volume 2 et 3.

De Mey, J.R. 1983a. Colloïdal gold probes in immunocytochemistry. Dans *Immunocytochemistry, practical applications in patholoy and biology* Edité par Polak, J.M. et Van Noorden, S. Wright-PSG, pages 82-112.

De Mey, J.R. 1983b. The preparation of immunoglobulin gold conjugates (IGS reagents) and their use as markers for light and electron microscopic immunocytochemistry. Dans *Immunocytochemistry* Edité par Cuello, A.C., Ibro, pages 347-372.

Garzon, S., Bendayan, M. et Kurstak, E. 1982. Ultrastructural localization of viral antigens using the protein A-gold technique. J. Virol. Meth. 5: 67-73.

Gelderblom, H.R., Hausmann, E.H.S., Özel, M., Pauli,G. et Koch,M.A. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. Virology 156: 171-176.

Goodman, S.L., Hodges, G.M. et Livingston, D.C. 1980. A review of the colloïdal gold marker system. In *Scanning electron microscopy II.* Edité par Johari, O., Chicago SEM, Inc., AMF O'Hare, pages 133-146.

Goodman, S.L., Hodges, G.M., Trejdosiewicz, L.K. et Livingston, D.C. 1981. Colloïdal gold markers and probes for routine application in microscopy. J. Microsc. 123: 201-213.

Harmon, S.A., Robinson, E.N. Jr. et Summers, D.F. 1985. Ultrastructural localization of L and NS enzyme subunits on vesicular stomatitis virus RNPs using gold sphere-Staphylococcal protein A-monospecific IgG conjugates. Virology 142: 406-410.

Hopley, J.F.A. et Doane, F.W. 1985. Development of a sensitive protein A-gold immunoelectron microscopy method for detecting viral antigens in fluid specimen. J. Virol. Meth. 12: 135-147.

Hyatt, A.D., Eaton, B.T. et Lunt, R. 1987. The grid-cell-culture technique: the direct examination of virus infected cells and progeny viruses. J. Microsc. 145: 97-106.

Murti, K.G. et Webster, R.G. 1986. Distribution of hemagglutinin and neuraminidase on influenza virions as revealed by immuno-electron microscopy. Virology 149: 36-43.

Polak, J.M. et Varndell, I.M. 1984. *Immunolabelling for electron microscopy,* Elsevier,

Roth, J. 1983b. Application of lectin-gold complexes for electron microcopic localization of glycoconjugates on thin sections. J. Histochem. Cytochem. 31: 987-999.

Roth, J. 1986. Post-embedding cytochemistry with gold-labelled reagents: a review. J. Microsc. 143: 125-137.

Slot, J.W. et Geuze, H.J. 1984. Gold markers for single and double immunolabelling of ultrathin cryosections. Dans *Immunolabelling for electron microscopy* Edité par Polak, J.M. et Varndell, I.M., Elsevier, pages 129-142.

Slot, J.W. et Geuze, H.J. 1985. A new method of preparing gold probes for multiple labelling cytochemistry. Eur. J. Cell Biol. 38: 87-93.

Stannard, L.M., Fuller,A.O. et Spear, P.G. 1987. Herpes simplex virus glycoproteins associated with different morphological entities projecting from the virion envelope. J. Gen. Virol. 68: 715-725.

Tijssen, P. 1985. *Practice and theory of enzyme immunoassays.* Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: Volume 15. Elsevier, 549 pages.

Tokuyasu, K.T. 1986. Application of cryoultramicrotomy to immunocytochemistry. J. Microsc. 143: 139-149.

Webster, H. de F., Lamperth, L., Favilla, J.T., Lemke, G., Tesin, D. et Manuelidis, J. 1987. Use of biotinylated probe and "in situ" hybridization for light and electron microscopic localization of P0 mRNA in myelin-forming Schwann cells. Histochem. 86: 441-444.

# 19

# RADIO-MARQUAGE MÉTABOLIQUE ET CHIMIQUE

André Fafard

## 1. INTRODUCTION

Le marquage radioactif des principales classes de macromolécules biologiques (acides nucléiques, protéines, polysaccharides et lipides) constitue un outil de base en virologie. Le marquage des acides nucléiques intervient dans la cartographie oligonucléotidique, le séquençage, l'étude des mécanismes biochimiques du contrôle de la transcription et de l'expression génétique et dans la préparation de sondes. Le marquage des protéines intervient dans l'étude de la traduction des ARNm, son contrôle, la modification subséquente de protéines pré-sécrétoires, la localisation et l'assemblage de structures protéiques et, enfin, dans la préparation de réactifs radio-immunologiques. Le marquage des polysaccharides et des lipides est moins couramment employé. Les anticorps monoclonaux, qui sont des glycoprotéines, peuvent être marqués dans leur portions oligosaccharidiques. Le marquage de lipides peut être employé dans l'investigation de membranes artificielles, les liposomes, et de membranes naturelles.

La sélection d'une méthode de marquage radioactif, selon l'application, se fait soit parmi les méthodes d'incorporation métabolique *in vivo* de précurseurs appropriés, soit par l'incorporation métabolique, *in vitro*, en culture cellulaire ou en système acellulaire, ou encore par l'addition enzymatique ou chimique *in vitro* d'un radio-isotope. Ces options impliquent des choix de type de radioactivité (bêta ou gamma), d'énergie d'émission, de demi-vie physique et biologique, d'activité spécifique et de distribution intramoléculaire de marquage (Tableau 1).

Le système d'unités physiques retenu est le système international (SI) adopté par la Commission Internationale des Unités de Radiation (C.I.U.R.). Dans ce système l'unité de radioactivité est le becquerel (Bq) et correspond à une désintégration radioactive par seconde ou $2.7 \times 10^{-11}$ curie dans l'ancien système. L'unité d'énergie absorbée est le gray (Gy) égal à 1 joule/kilogramme ou 100 rads dans l'ancien système. Enfin, l'unité d'équivalence de dose est le sievert (Sv) et correspond à 100 rems dans l'ancien système.

Tableau 1

Paramètres nucléaires des principaux radio-isotopes

| Nucl. | Z | $t_{1/2}$ | λ ($sec^{-1}$) | Activité spécifique (TBq/mA) | Énergie gamma (Mev) | Énergie bêta (Mev) | Iγ (mGr/h /GBq) | Organes cibles | Dose par MBq interne (Sv) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $^{3}H$ | 1 | 12.3a | $1.79x10^{-9}$ | 1.07 | | 0.018 | | corps entier | $5.70x10^{-5}$ |
| $^{14}C$ | 6 | 5730a | $3.81x10^{-12}$ | $2.3x10^{-3}$ | | 0.155 | | graisses | $6.50x10^{-4}$ |
| $^{32}P$ | 15 | 14.3j | $5.60x10^{-7}$ | 338 | | 1.70 | | os | $1.03x10^{-2}$ |
| | | | | | | | | tractus G.I. | $5.70x10^{-3}$ |
| $^{35}S$ | 16 | 86.7j | $9.20x10^{-8}$ | 55.7 | | 0.17 | | testicules | $2.70x10^{-3}$ |
| | | | | | | | | peau | $4.60x10^{-4}$ |
| $^{51}Cr$ | 24 | 27.8j | $2.90x10^{-7}$ | 174 | 0.32 | | 49 | tractus G.I. | $3.20x10^{-4}$ |
| | | | | | | | | prostate | $1.00x10^{-6}$ |
| | | | | | | | | thyroïde | $1.00x10^{-6}$ |
| $^{60}Co$ | 27 | 5.26a | $4.19x10^{-9}$ | 2.52 | 1.17 | 0.31 | 3541 | tractus G.I. | $1.05x10^{-3}$ |
| | | | | | | | | pancréas | $7.02x10^{-4}$ |
| | | | | | | | | foie | $5.70x10^{-4}$ |
| $^{111}In$ | 49 | 2.8j | $1.20x10^{-6}$ | 1725 | 0.17 | | | | |
| | | | | | 0.25 | | | | |
| $^{125}I$ | 53 | 60.2j | $1.33x10^{-7}$ | 80.2 | 0.035 | | 162 | thyroïde | 0.16 |
| $^{131}I$ | 53 | 8.05j | $9.93x10^{-7}$ | 600 | 0.360 | 0.61 | 595 | thyroïde | 0.51 |
| | | | | | 0.720 | 0.81 | | | |

Les quelques notions qui suivent permettent de relier quantitativement la radioactivité, la masse, l'activité spécifique et l'incorporation. La masse de radio-isotope correspondant à une radioactivité se calcule avec l'équation:

$$W = 2.07 \times 10^{-4} \times TBq \times t_{1/2}$$

où W = la masse en milligram-atomes

TBq = la radioactivité en térabecquerels (TBq = $10^{12}$ Bq)

$t_{1/2}$ = la demi-vie physique du radio-isotope (en jours)

La masse en milligrammes est donc W divisé par la masse atomique du radio-isotope (exemple: 125 pour l'iode[125]).

L'activité spécifique (AS) d'un isotope pur se calcule avec l'équation précédente transformée:

$$AS = \frac{TBq}{W} = \frac{4831}{t_{1/2}}$$

où AS est exprimé en térabecquerels/ milligramatome (mGr). La demi-vie physique ($t_{1/2}$) caractéristique d'un radionucléide est le temps requis pour que la radioactivité d'une population de ce radionucléide décroisse de moitié. La radioactivité décroît exponentiellement selon l'équation:

$$N_t = N_o \times e^{-\lambda t}$$

Dans laquelle:

$N_o$ = la radioactivité initiale

$N_t$ = la radioactivité après t secondes

$\lambda$ = la constante de radioactivité caractéristique de chaque radionucléide en $sec^{-1}$

Il découle de l'équation précédente que

$$N_t = N_o \cdot e^{-0.693t/t_{1/2}}$$

Ainsi, connaissant la demi-vie d'un radio-isotope ($t_{1/2}$) et la radioactivité ($N_o$) d'un échantillon à un moment donné, il est possible de déterminer sa radioactivité ($N_t$) à tout autre moment après un temps déterminé (t).

Il est nécessaire de connaître les caractéristiques physiques des radio-isotopes employés de manière à guider le choix des méthodes de détection ou de comptage et des mesures de radio-sécurité appropriées. Les paramètres pertinents sont résumés sous la forme d'un tableau pour les radionucléides d'usage courant. Les valeurs Iγ données dans ce tableau correspondent à la dose absorbée par voie externe à 1 centimètre d'une source par heure par gigabecquerel ($10^9$Bq) de radioactivité. Ce paramètre permet de calculer la dose absorbée (D) en mGr/h à toute distance (d) en centimètres d'une source de radioactivité exprimée en gigabecquerels (Gb) avec l'équation:

$$D = \frac{I\gamma\, Gb}{d^2}$$

Les expositions internes à l'organe critique données dans le tableau, résultant de l'ingestion de radio-isotopes, sont estimées à partir de leurs demi-vies physiques et biologiques.

Lors de manipulations, l'exposition devrait être maintenue inférieure à 0.02 mSv/h soit par l'emploi d'écrans protecteurs, s'il y a lieu, soit simplement en limitant la durée des manipulations et en maintenant la source à distance. La contamination interne peut être minimisée en travaillant sous une hotte chimique avec les radio-isotopes volatiles tels que l'iode et, de façon générale, en adoptant des méthodes analogues aux méthodes aseptiques.

## 2. ACIDES NUCLÉIQUES

Les acides ribonucléiques et désoxyribonucléiques peuvent être marqués par incorporation métabolique de l'un ou l'autre des nucléotides radioactifs parmi une large sélection disponible commercialement. Plusieurs méthodes enzymatiques permettent également l'incorporation *in vitro* de ces mêmes précurseurs. Des méthodes chimiques de radiomarquage et plus particulièrement de radioiodation existent. Les radio-isotopes employés comme marqueurs des acides nucléiques sont le phosphore–32, le soufre–35, le tritium, le carbone–14 et l'iode–125. Les précurseurs marqués avec les autres radio-isotopes peuvent généralement être substitués dans les méthodes décrites ici pour le phosphore–32.

L'efficacité d'une méthode de marquage est évaluée par le degré d'incorporation du radio-isotope. Pour ce faire, appliquer sur un filtre de 2.45 cm Whatman GF/C en fibre de verre un volume précis du milieu de réaction n'excédant pas 10 µL. Placer le même aliquot dans 100 µl d'ADN porteur 500 µg/mL dans l'EDTA 20 mM. Ajouter 5 mL d'acide trichloracétique (TCA) 10% glacé, mélanger et incuber 15 min sur la glace. Recueillir sur un second filtre GF/C identique le précipité TCA. Rincer le filtre avec six autres aliquots de 5 mL de TCA 10% glacé suivi de 5 mL d'éthanol 95%. Assécher les deux filtres, ajouter un cocktail de scintillation et compter la radioactivité. Le rapport de

la radioactivité TCA précipitable et de la radioactivité initiale représente la fraction d'incorporation.

## 2.1. MARQUAGE *IN VIVO*

Les acides nucléiques viraux peuvent être marqués par voie métabolique sur culture cellulaire en présence de précurseurs radioactifs dont le phosphore–32 inorganique et les nucléotides marqués au $^{32}P$, $^{3}H$, $^{14}C$, $^{125}I$ ou $^{35}S$. L'incorporation *in vivo* d'orthophosphate ($^{32}P$) de sodium produit des acides nucléiques uniformément marqués, ce qui est idéal pour la cartographie oligonucléotidique. L'incorporation d'un précurseur radioactif est favorisée par l'emploi d'un milieu de culture déficient de la version non-radioactive de ce précurseur. Toutefois, un choix doit parfois être fait entre une incorporation élevée et la réplication efficace du virus. L'emploi d'une quantité réduite de sérum de fœtus de veau de même que des volumes réduits de milieu de culture favorise également l'incorporation efficace du radio-isotope.

Avec le phosphore–32 inorganique, la concentration choisie (5 à 100 MBq) est ajoutée 1 à 10 h post-infection au milieu de culture dépourvu de ou déficient en phosphate. Avec les virus qui ne produisent pas d'infection lytique, le marqueur est ajouté au moment où les cellules répliquent le virus au taux maximum. Le travail de Shaw *et al.* (1977) avec l'ADN viral EBV qui se réplique dans les cellules Raji surinfectées est un exemple de marquage d'ADN *in vivo* avec le phosphore–32 inorganique. Le travail de Meinkoth et Kennedy (1980) avec le virus de la forêt de Semliki répliqué dans la lignée cellulaire murine L929 est un exemple avec un virus à ARN.

## 2.2. TRANSCRIPTION ACELLULAIRE *IN VITRO*

Un système acellulaire d'extrait de cellules HeLa a été développé par Manley *et al.* (1980) pour l'étude des mécanismes biochimiques du contrôle de la transcription et de l'expression génétique chez les eucaryotes. La transcription en ARNm d'ADN exogène lié à un promoteur dépend de l'ARN polymérase II d'origine cellulaire caractérisée par sa propriété d'être inhibée par l'α–amanitine. Ce système n'est pas recommandé pour la préparation de sondes d'hybridation, les autres méthodes décrites étant mieux adaptées à cette fin.

## 2.3. MARQUAGE ENZYMATIQUE *IN VITRO*

### 2.3.1. Synthèse d'ARNc

Les ARN polymérases de bactériophages dont celle du bactériophage SP6 de *Salmonella thyphimurium* ou du bactériophage T7 de *E.coli* sont caractérisées par leurs exigences très spécifiques en termes de segments de promotion et de terminaison et par un taux de transcription supérieur d'un ordre de grandeur à celui de l'ARN polymérase de *E.coli*. Les ARN polymérases de bactériophages se recyclent plus efficacement que les polymérases d'origine bactérienne. En pratique, les fragments d'ADN à être transcrits sont clonés dans les vecteurs pSP64 ou pGEM™-2 porteurs des promoteurs des ARN polymérases de SP6 et T7 respectivement, immédiatement en amont de sites de clonage multiples. Pour la transcription, l'ADN recombinant est linéarisé avec une enzyme de restriction qui scinde le plasmide en aval du promoteur et de l'insertion d'ADN. Des copies d'ARN spécifiques homogènes résultent de la

transcription *in vitro* par la polymérase du bactériophage. Dans ce système, l'emploi d'enzymes de restriction générant des extrémités saillantes produit des quantités significatives de longues copies d'ARN complémentaires au vecteur. Lorsque ces enzymes de restriction doivent être employées, ce problème peut être évité en comblant les extrémités 5' saillantes avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase.

Les ARN polymérases de phages peuvent être employées pour préparer des sondes à partir d'oligonucléotides synthétiques comportant, en plus de la séquence d'hybridation à l'extrémité 3', la séquence tétranucléotidique de l'ADN du site de restriction *Pst* 1. Ils sont recombinés avec les vecteurs pSP64 ou pGEM™–2 linéarisés avec *Pst* 1. L'ADN polymérase de *E.coli* complète le brin complémentaire à l'oligonucléotide synthétique puis la transcription est faite par l'ARN polymérase de bactériophage en présence de précurseurs radioactifs pour produire les sondes d'ARN.

**Solutions**

*Tampon ARN polymérase 5X*

Tris HCl pH 7.9 ..... 0.2M

$MgCl_2$ ..... 30 mM

Spermidine ..... 10 mM

Dithiothréitol ..... 50 mM

NaCl ..... 50 mM

**Méthode**

1. Scinder le plasmide recombinant avec l'enzyme de restriction approprié, puis faire l'extraction au phénol: chloroforme et la précipitation à l'éthanol de l'ADN linéarisé selon les méthodes standards.
2. Placer dans un microtube placé sur de la glace:

   ADN linéarisé ..... 0.2–1 µg

   Tampon ARN polymérase 5X ..... 10 µL

   NTP (2.5 mM chacun des quatre) ..... 10 µL

   RNAsin® (Promega Biotec, Madison, Wisconsin) ..... 50 U

   ($\alpha^{-32}$P) GTP ou [$\alpha^{-32}$P] CTP, 100 TBq/mmole ..... 10 MBq

   $H_2O$ bidistillée à ..... 50 µL

3. Initier la réaction avec 2–10 unités d'ARN polymérase de SP6 ou T7 et incuber à 37 ou 40°C respectivement pendant 1 h. Ajouter 50 µg d'ARNt porteur et 15 µg de DNAse contenant 70 unités de RNAsin™ puis incuber la réaction 10 min. Faire l'extraction au phénol: chloroforme et la précipitation à l'éthanol de l'ARNc marqué selon les méthodes standards.

### 2.3.2. Synthèse d'ADNc par la transcriptase inverse

De courtes sondes d'ADNc peuvent être synthétisées sur matrices ARN ou ADN monocaténaire avec une ADN polymérase ARN dépendante (transcriptase inverse) tel que la transcriptase inverse du rétrovirus de la myéloblastose aviaire (VMA). Certaines conditions optimales favorisent l'obtention de copies intégrales pour la préparation d'ADN recombinant. La synthèse d'ADNc requiert, en plus d'une matrice et d'une transcriptase inverse, la présence d'une amorce pour la réaction d'addition. Ces amorces sont des séquences d'oligonucléotides dont la séquence complémentaire se retrouve dans la matrice. Elles peuvent être des

séquences homopolymériques tels que les oligo (dT) qui se lient aux séquences 3' terminales des ARN messagers (ARNm) ou d'autres oligo (dNTP) se liant à des séquences terminales synthétiques complémentaires.

L'ATP:ARN adényltransférase peut être employée pour greffer une terminaison 3' polyadénylique aux ARN viraux. Enfin, des séquences aléatoires préparées à partir d'ADN de thymus de veau ou de sperme de saumon sont également des amorces efficaces avec tout ARN de plus de 660 bases. Avec les ARN de moins de 330 bases, les amorces aléatoires produisent peu ou pas d'ADNc.

### 2.3.3. Synthèse d'ADN par mécanisme de réparation ("Nick translation" ou coupure-substitution)

Des sondes radioactives ADN peuvent être synthétisées sur matrices ADN bicaténaire, encoché avec l'ADNse I, par un **mécanisme de réparation par l'ADN polymérase I de *E.coli*.** Cette enzyme exhibe les activités 5'–3' exonucléase, 5'–3' polymérase et 3'–5' exonucléase. L'ADN bicaténaire encoché est marqué par excision progressive 5'–3' des nucléotides et leur remplacement 5'–3' par des nucléotides marqués sur la matrice monocaténaire résultante. Le degré d'incorporation est indépendant de la nature du nucléotide employé mais reflète sa concentration, son activité spécifique et aussi le nombre d'encoches introduites dans l'ADN. Dans la méthode classique l'ADNase I et l'ADN polymérase I agissent simultanément, mais une modification dissociant la réaction en deux étapes permet un meilleur contrôle sur le marquage et la longueur des sondes.

**Solution**

*Tampon NT 10X*

Tris HCl pH 7.2 ..... 0.5 M

$MgS0_4$ ..... 0.1 M

Dithiothréitol ..... 1 mM

Albumine sérique bovine (ASB) ..... 500 µg/mL

**Méthode**

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN matrice ..... 1 µg

   Tampon NT 10X ..... 5 µL

   dNTP 1 mM (les 4) ..... 1 µL

   ($\alpha$-$^{32}$P) dNTP, 30 TBq/mmol, 100 pmoles ..... 12 MBq

   $H_2O$ bidistillée à ..... 44 µL

   ADNase I (0.1 µg/mL de tampon NT contenant du glycérol 50%) ..... 0.5 µL

   ADN polymérase I ..... 5 U

2. Incuber 60 min à 16°C. Eviter les températures d'incubation supérieures qui favorisent la synthèse non désirée de copies complémentaires aux brins nouvellement synthétisés. Arrêter la réaction avec 1 µL d'EDTA 0.5 M.

3. Inactiver la ADNase et l'ADN polymérase 5 min à 70°C. Isoler la sonde par chromatographie sur colonne de Sephadex G–50.

### 2.3.4. Système multiprime

Ce système de radiomarquage de l'ADN est une synthèse catalysée par le fragment de Klenow lequel est généré par l'hydrolyse à la subtilisine de l'ADN polymérase I de *E.coli*. Le fragment de Klenow conserve l'activité polymérase et l'activité 3'–5' exonucléase de l'ADN polymérase I, mais pas l'activité 5'–3' exonucléase. La synthèse est amorcée avec des hexanucléotides aléatoires 3' hydroxyl terminaux préparés par digestion à la déoxyribonucléase pancréatique de l'ADN de thymus de veau. Ces amorces sont disponibles commercialement comme éléments de trousses de synthèse de sondes radioactives. Des sondes de 800 nucléotides en moyenne peuvent être obtenues ayant une activité spécifique excédant $10^9$ dpm/µg à partir de moins de 0.1 µg d'ADN matrice.

**Solutions**

*Réactif A*

Tris HCl pH 8 ..... 0.25 M

$MgCl_2$ ..... 25 mM

ß–mercaptoéthanol ..... 50 mM

dATP, dGTP, dTTP
chacun ..... 100 mM

*Réactif B*

Tris HCl pH 7.5 ..... 1 mM

EDTA ..... 1 mM

Hexa-désoxy-
nucléotides ..... 90 unités $A_{260}$/mL

Facteur de conversion:
ADN (µg/mL) = 43 ($A_{260}$ – $A_{300}$)

*Mélange réactif:*

HEPES 1 M, pH 6.6 ..... 25 vol.

Réactif A ..... 25 vol.

Réactif B ..... 7 vol.

**Méthode**

1. Dénaturer l'acide nucléique matrice (2.5 µL à 25 µg/mL dans un tube capillaire scellé) pendant 2 min dans l'eau bouillante, puis plonger le capillaire dans un bain de glace.

2. Placer dans un microtube, sur la glace:

   ADN matrice (63 ng) ..... 2.5 µL

   Mélange réactif ..... 11.4 µL

   Albumine sérique bovine
   (10 mg/mL) ..... 1 µL

   [$\alpha$-$^{32}$P] dCTP
   100 TBq/mmol. ..... 2 MBq

   Fragment de Klenow ..... 2.5 U

   $H_2O$ bidistillée ..... 25 µL

3. Incuber la réaction pendant 2 h à la température ambiante. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol de la sonde d'ADN selon les méthodes standards.

### 2.3.5. Synthèse de sondes d'ADN sur matrices synthétiques

L'étude de variations alléliques requiert de courtes sondes hautement radioactives et très spécifiques. De telles sondes ont été préparées par Hellman et Petterson (1987) en employant une réaction d'addition avec le fragment de Klenow et deux

oligonucléotides synthétiques partiellement complémentaires. L'exemple traite des gènes de chaînes lourdes d'IgA humaines dans lesquelles on obtient une sonde de 28 pb à partir d'un octodécadésoxynucléotide et d'un hexadécadéoxynucléotide complémentaires pour les huit nucléotides 3' terminaux.

**Solution**

*Tampon 10X*

Tris HCl pH 7.5 ..... 0.1 M

$MgCl_2$ ..... 0.1 M

NaCl ..... 0.6 M

Albumine sérique bovine ..... 500 µg/mL

**Méthode**

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   **Oligonucléotides partiellement complémentaires,** chacun ..... 0.5 pmole

   [$^{\alpha-32}$P] dNTP, 100 TBq/mmol, 2.5 pmoles pour chaque position à combler, 45 pmoles au total ..... 4.5 MBq

   Tampon 10X ..... 5 µL

   Fragment de Klenow ..... 4 U

   $H_2O$ bidistillée à ..... 50 µL

2. Incuber la réaction 30 min à 16°C. Ajouter 20 U de fragment de Klenow et incuber 30 min additionnelles à 25°C. Faire l'extraction au phénol en présence de SDS 0.5%. Chromatographier la phase aqueuse sur colonne de Sephadex G–50. Ajouter 50 µg d'ARNt porteur et faire une précipitation à l'éthanol dans les conditions habituelles.

### 2.3.6. Synthèse de sondes d'ADN avec le système M13

Le système M13 est un système de synthèse d'ADNc spécifiques catalysé par le fragment Klenow pour fins de séquençage ou de préparation de sondes d'hybridation. Des vecteurs de clonage ont été construits à partir de l'ADN circulaire monocaténaire du bactériophage M13. La forme réplicative (FR) bicaténaire de M13 peut être recombinée *in vitro* avec des fragments de restriction exogènes pour ensuite être répliquée en phages ADN monocaténaires recombinants. Des sous-clones M13 (e.g. M13 mp 7, M13 mp 8) ont été construits avec une partie du gène lac de *E.coli* intégrant un multisite de restriction. La séquence située à cette région en 3' constitue la matrice pour l'amorce universelle de séquençage permettant la synthèse spécifique du brin complémentaire (–) à l'ADN exogène introduit. D'autres sous-clones (dont M13 mp 9) ont été construits avec le multisite de restriction dans l'orientation inverse permettant avec la même amorce de séquencer par l'autre extrémité. Une seconde amorce, l'amorce universelle de séquençage inverse, existe dans ce système, qui a la propriété de s'hybrider au brin complémentaire (–), après dénaturation thermique de l'ADN–lac de M13–FR. Cette amorce initie la synthèse à l'extrémité 5' du brin (+) de l'ADN intégré. L'emploi des deux amorces universelles permet donc le séquençage par les deux extrémités d'un fragment d'ADN avec un seul vecteur M13.

Pour la préparation de sondes spécifiques M13, on a développé une amorce universelle d'hybridation (complémentaire pour la région située en 5' du

multisite de restriction du vecteur monocaténaire M13 mp 7) qui initie la synthèse en présence de précurseurs radioactifs, du brin complémentaire (–) au vecteur en aval de l'insertion. Les conditions sont ajustées telles que la synthèse du brin complémentaire demeure incomplète, laissant à l'état monocaténaire le segment d'ADN intégré. Ainsi, une sonde circulaire, partiellement bicaténaire et hautement radioactive est obtenue qui est spécifique pour la séquence intégrée.

**Solutions**

*Tampon H*

Tris HCl pH 7.9 ..... 1000 mM

NaCl ..... 600 mM

$MgCl_2$ ..... 66 mM

**Méthode**

1. Placer dans un microtube:

   Amorce d'hybridation synthétique M13 (2 ng) ..... 1 µL

   Vecteur M13 recombinant monocaténaire (50 ng) ..... 1 µL

   Tampon H ..... 1.5 µL

   Dithiothréitol 0.1 M ..... 1 µL

   $H_2O$ bidistillée ..... 4.5 µL

2. Incuber 15 min à 65°C puis équilibrer à la température ambiante.

3. Ajouter:

   [$\alpha^{-32}$P] dATP 100 TBq/mmol ..... 400 MBq

   dCTP, dGTP, dTTP 500 µM chacun ..... 1 µL

   Fragment de Klenow (500 U/mL) ..... 1 µL

4. Incuber 60 min à la température ambiante.

5. Arrêter la réaction avec 1 µL d'EDTA 0.25 M pH 8.3. Conserver la sonde sur la glace.

### 2.3.7. Marquages terminaux

Les méthodes de marquage précédentes comportaient toutes la synthèse *de novo*, sur matrices, en présence de précurseurs radioactifs, de copies d'acides nucléiques marquées de façon relativement uniforme. Pour marquer des acides nucléiques disponibles *a priori*, il existe une sélection d'enzymes permettant l'addition spécifique de nucléotides ou d'analogues radio-actifs à leurs extrémités 3' ou 5'. L'activité spécifique atteinte est inférieure à celle obtenue par les méthodes de marquage uniforme. Bien que les acides nucléiques ainsi marqués puissent être employés comme sondes d'hybridation, leur champ d'application principal est le séquençage de gènes par clivage chimique spécifique.

#### 2.3.7.1. T4 polynucléotide kinase

La T4 polynucléotide kinase catalyse le transfert du γ-phosphate de l'ATP à l'hydroxyl 5' terminal de l'ARN, de l'ADN monocaténaire ou de l'ADN bicaténaire avec l'extrémité 5' saillante.

**Solutions**

*Tampon phosphatase*

Tris HCl pH 8 ..... 50 mM

EDTA ..... 5 mM

*Tampon kinase 10X*

Tris HCl pH 8 ..... 50 mM

$MgCl_2$ ..... 0.1 M

Dithiothréitol ..... 50 mM

Spermidine ..... 1 mM

EDTA ..... 1 mM

**Méthode**

1. Déphosphorylation (s'il y a lieu). Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN ou ARN, extrémités 5' ..... 100 pmoles

   Tampon phosphatase ..... 150 µL

   Phosphatase alcaline intestinale de veau ..... 4-8 U

2. Incuber pendant 1 h à 37°C. Inactiver la phosphatase pendant 10 min à 65°C. Faire 5 extractions au phénol: chloroforme suivies d'une précipitation à l'éthanol.

3. Pour le marquage placer dans un microtube sur la glace:

   ADN ou ARN déphosphorylé extrémité 5' ..... 50 pmoles

   ($\gamma^{-32}$) ATP 100 TBq/mmol 50 pmoles ..... 6 MBq

   Tampon kinase 10X ..... 10 µL

   T4 polynucléotide kinase ..... 10-20 U

   $H_2O$ bidistillée à ..... 50 µL

4. Incuber pendant 30 min à 37°C. Arrêter la réaction avec 2 µL d'EDTA 0.5 M. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol.

### 2.3.7.2. Terminale transférase

La désoxynucléotidyl 3' terminale transférase du thymus de veau est employée pour marquer les fragments d'ADN mono ou bicaténaires aux extrémités 3'. L'enzyme accepte les précurseurs de nature ribo ou désoxyribonucléotidiques. L'ADN monocaténaire est la matrice normale, mais en présence de cobalt substitué au magnésium en temps que cofacteur, l'enzyme accepte aussi les ADN bicaténaires. La terminale transférase additionne successivement les ribonucléotides à l'extrémité 3' d'un fragment d'ADN. Une hydrolyse alcaline subséquente du brin ribonucléotidique laisse deux groupes phosphates–$^{32}$P, soit le premier ($\alpha^{-32}$P) ribonucléotide greffé et le groupement phosphate–$^{32}$P provenant du second. Alternativement, l'emploi d'un analogue 3' déoxy, qui interrompt la synthèse, la 3'–désoxyadénosine–5'–triphosphate (cordycépin–5' triphosphate), permet d'obtenir un produit mono-additionné en 3' fréquemment employé pour le séquençage.

**Solution**

*Tampon cacodylate*

Cacodylate de sodium pH 7.6 ..... 1 M

Tris ..... 0.25 M

Dithiothréitol ..... 2 mM

**Méthode**

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN, extrémités 3' 10 pmoles ..... 15 µL

[$\alpha^{-32}$P] cordycépin-5'–triphosphate, 200–300 TBq mmol., 20 pmoles, 6 MBq ..... 10 µL

$CoCl_2$ 10 mM ..... 3.5 µL

Tampon cacodylate ..... 3.5 µL

Terminal transférase (20 U/mL) ..... 2 µL

2. Incuber pendant 60 min à 37°C. Ajouter 215 µL d'eau bidistillée, 25 µL d'acétate de sodium 3 M et 750 µL d'éthanol 96%. Incuber pendant 10 min à –70°C ou 30 min à –20°C. Répéter la précipitation à l'éthanol.

### 2.3.7.3. Fragment de Klenow

Le fragment de Klenow peut être employé pour marquer les extrémités 3' en retrait de fragments bicaténaires d'ADN. Le choix du désoxynucléotide radioactif à employer est dicté par la séquence de l'extrémité 5' saillante. Les fragments *EcoR* I sont habituellement marqués au [$\alpha^{-32}$P] dATP tandis que les fragments *BamH* I sont marqués au [$\alpha^{-32}$P] dGTP. Toutefois on peut utiliser un autre désoxynucléotide radioactif, s'il est complémentaire à une des bases de l'extrémité 5' saillante, à condition que les désoxynucléotides le précédant dans la séquence soient inclus dans la réaction. Le cas échéant, il n'est pas nécessaire d'enlever ou d'inactiver les enzymes de restriction ou de procéder à un échange de tampon avant le marquage.

**Solutions**

*Tampon polymérase 10 X*

Tris HCl pH 7.6 ..... 0.2 M

$MgCl_2$ ..... 100 mM

β–mercaptoéthanol ..... 15 mM

Dithiothréitol ..... 25 mM

**Méthode**

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ADN ..... 1 µg

   Tampon polymérase 10X ..... 2 µL

   $H_2O$ bidistillée à ..... 19 µL

2. Cliver avec une enzyme de restriction, puis ajouter:

   dNTP 2 mM (lorsque nécessaire) ..... 1 µL

   [$\alpha^{-32}$P] dNTP (selon l'enzyme de restriction), 2 pmoles ..... 75 KBq

   Fragment de Klenow ..... 1 U

   $H_2O$ bidistillée à ..... 25 µL

3. Incuber pendant 30 min à la température ambiante. Arrêter la réaction avec 1 µL d'EDTA 0.5 M. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol selon les méthodes standards.

### 2.3.7.4. ADN polymérase de T4

L'ADN polymérase du bactériophage T4 possède, comme le fragment de Klenow, une activité polymérase et une activité 3'–5' exonucléase. Cette dernière, toutefois, est 200 fois plus grande que celle du fragment de Klenow. L'enzyme marque l'extrémité 3' d'ADN bicaténaires par réaction d'addition avec les extrémités 3' en retrait et par réaction d'échange avec les autres types d'extrémités. Pour la réaction d'échange, un seul dNTP est fourni.

Les nucléotides sont successivement clivés de l'extrémité 3' de l'ADN bicaténaire grâce à l'activité exonucléase de l'enzyme jusqu'à ce que soit exposé la base complémentaire au [$\alpha$-$^{32}$P] dNTP inclus. La base est ensuite continuellement additionnée, puis échangée jusqu'à l'interruption de la réaction. Dans la réaction d'addition la présence des quatre dNTP masque l'activité 3'–5' exonucléase au profit de l'activité polymérase de l'enzyme. Le produit est un fragment bicaténaire complété avec un ou quelques nucléotides marqués près de l'extrémité 3'. Le tampon employé avec l'ADN polymérase de T4 n'est pas compatible avec toutes les enzymes de restriction, de sorte qu'il est parfois nécessaire d'extraire les fragments de restriction au phénol: chloroforme et de les reprendre dans le tampon TE (Tris–HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.9) avant de procéder au marquage.

**Solutions**

Tampon polymérase T4, 10X

Tris acétate pH 7.9 ..... 0.33 M

Acétate de potassium ..... 0.66 M

Acétate de magnésium ..... 0.10 M

Dithiothréitol ..... 5 mM

Albumine sérique bovine ..... 1 mg/mL

**Méthode**

1. Avec les enzymes de restriction qui sont compatibles avec le tampon polymérase, placer dans un microtube:

   ADN ..... 0.5-2.0 µg

   Tampon polymérase 10X ..... 2 µL

   $H_2O$ bidistillée à ..... 19 µL

2. Traiter avec l'enzyme de restriction, puis ajouter:

   dNTP 2 mM (chacun de trois) .... 1 µL

   [$\alpha$-$^{32}$P] dNTP (le quatrième), 2 pmoles ..... 75 KBq

   ADN polymérase de T4 (2.5 U/µl) ..... 1 µL

3. Incuber pendant 5 min à 37°C, puis ajouter:

   dNTP 1 mM (le quatrième) ..... 1 µL

4. Incuber pendant 10 min à 37°C. Arrêter la réaction en incubant pendant 5 min à 70°C. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol selon les méthodes standards.

### 2.3.7.5. ARN ligase de T4

L'ARN ligase de T4 catalyse la formation ATP–dépendante d'un lien phosphodiester internucléotidique entre un phosphate 5' terminal (donneur) et un hydroxyl 3' terminal d'ARN (accepteur). Si le donneur est un nucléoside 3', [5'-$^{32}$P]–biphosphate et l'accepteur un ARN 3'–déphosphorylé, le produit sera un ARN, allongé d'un nucléoside 3' phosphate comportant un phosphate–$^{32}$P dans la dernière liaison internucléotidique.

**Solutions**

*Tampon ligase*

HEPES pH 8.3 ..... 75 mM

ATP ..... 7.5 mM

$MgCl_2$ .....15 mM

Dithiothréitol .....5 mM

Diméthylsulfoxyde .....15% (v/v)

Glycérol .....23% (v/v)

**Méthode**

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   ARN 3'–0H .....1 µg

   Tampon ligase .....20 µL

   ARN ligase de T4 .....6 U

   [5'–$^{32}$P] pCp, 75 TBq/mmol, 50 pmoles .....4 MBq

   $H_2O$ bidistillée à .....30 µL

2. Incuber 16 h à 4°C. Faire l'extraction au phénol: chloroforme, la chromatographie sur Sephadex G–50 et la précipitation à l'éthanol selon les méthodes standards.

## 2.4. RADIO-MARQUAGE CHIMIQUE

Les méthodes chimiques sont peu utilisées pour le radiomarquage des acides nucléiques. Les précurseurs radioactifs chimiquement synthétisés employés dans les méthodes enzymatiques déjà décrites sont disponibles dans le commerce. Nous nous abstenons de décrire la synthèse des nucléotides [$\alpha$-$^{32}$P] phosphorylés et des nucléotides [5'–$^{35}$S] phosphorothioate. Les nucléotides [$^{125}$I] iodurés, par contre, ne sont pas couramment disponibles commercialement. Les sondes radioiodurées ont néanmoins certaines applications, dont les hybridations *in situ* et sur membranes. Bien que l'on puisse préférer les sondes au tritium ou au soufre–35 qui donnent moins de bruit de fond, pour certaines épreuves de routine, la radioiodation est une méthode simple qui s'adapte à la production en masse de sondes ayant une demi-vie acceptable de 60 jours.

### 2.4.1 Radio-iodation directe

La méthode d'iodation directe implique la 5' iodation de l'anneau pyrimidine de la cytidine à pH 5 en présence de l'agent oxydant, le chlorure de thallium. Les ADN monocaténaires étant plus susceptibles à l'iodation, les ADN bicaténaires doivent être dénaturés avant le marquage. Certains contaminants, dont les contaminants macromoléculaires qui peuvent compétitionner dans la réaction, les agents réducteurs et les agents chélatants, interfèrent avec l'iodation. L'emploi de températures élevées, d'agents oxydants, d'agents réducteurs et de radioactivité élevée risquent théoriquement d'entraîner une certaine dégradation des sondes. Néanmoins, l'iodation directe donne généralement des sondes fonctionnelles.

**Méthode**

1. **ADN bicaténaire**:

   Dénaturer l'ADN bicaténaire, 1 mg/mL d'eau pendant 10 min dans l'eau bouillante, puis équilibrer dans un bain de glace. Ajouter un volume de tampon acétate 0.02 M pH 5. L'iodation se fait en présence de tampon acétate de sodium 0.01 M pH 5.

   **ARN et ADN monocaténaires**:

   Dissoudre les acides nucléiques à 0.5 mg/mL dans un tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 5. L'iodation se fait dans ce tampon.

2. Placer dans un microtube sur la glace:

   Acide nucléique (0.5 mg/mL) ..... 4 µL

   KI 2.5 mM ..... 10 µL

   [$^{125}$I] NaI ..... 40 MBq

   $TlCl_3$ 15 mM (solution fraîche dans le tampon acétate de sodium 0.01 ou 0.1 M, pH 5) ..... 10 µL

   Tampon acétate de sodium 0.01 ou 0.1 M, pH 5 à ..... 100 µL

3. Incuber pendant 15 min à 60°C, puis équilibrer dans un bain de glace. Arrêter la réaction avec 25 µL de l'agent réducteur, le β–mercaptoéthanol 30 mM.

4. Après 2 min, dissocier les produits intermédiaires instables avec 50 µL de solution d'acétate d'ammonium 1 M–hydroxyde d'ammonium 0.5 M (pH 9) en incubant pendant 15 min à 60°C. Isoler l'acide nucléique marqué par chromatographie sur Sephadex G–50 et par précipitation à l'éthanol.

### 2.4.2. Radio-iodation indirecte

La méthode indirecte comprend la synthèse de [5–$^{125}$] I–dCTP ou [5–$^{125}$] I–CTP suivie de son incorporation enzymatique dans l'ADN ou l'ARN respectivement. La [5–$^{125}$ I] Iodocytidine 3', 5' biphosphate (pICp) peut également être synthétisée et être employée comme donneur avec l'ARN ligase de T4. La méthode d'iodation est essentiellement la même mais elle évite l'exposition des acides nucléiques aux conditions plus dénaturantes de la méthode directe.

**Méthode**

1. Placer dans un microtube sur la glace:

   dCTP ou CTP 10 mM ..... 4 µL

   [$^{125}$I] NaI ..... 140 MBq

   $TlCl_3$ 20 mM (solution fraîche dans le tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 5 ..... 0.8 µL

   Tampon acétate de sodium 0.1 M, pH 5 à ..... 80 µL

2. Incuber la réaction pendant 15 min à 60°C, puis équilibrer dans un bain de glace.

3. Arrêter la réaction avec 20 µL de sulfite de sodium 80 mM. Après 2 min, dissocier les produits intermédiaires instables avec 100 µL de solution d'acétate d'ammonium 1M–hydroxyde d'ammonium 0.5 M (pH 9) en incubant pendant 15 min à 40°C.

4. Diluer le mélange de réaction à 1 mL avec de l'eau et l'appliquer sur une colonne de DE–52 cellulose (Whatman) de 0.9 x 22 cm préalablement lavée avec 50 mL de tampon bicarbonate de triéthylammonium (BCTEA) 1 M, pH 8, puis équilibrée avec BCTEA 10 mM pH 8.

5. La charge appliquée, rincer la colonne avec 10 mL de tampon BCTEA 10 mM et éluer à 0.8 mL/min. avec 1 L de gradient linéaire de BCTEA, pH 8, variant de 0.01 M à 0.5 M.

6. Grouper les fractions contenant les triphosphates marqués et assécher en évaporant sous vide à 40°C. Reprendre le produit final dans 0.5 mL d'eau.

## 3. PROTÉINES

Le radiomarquage métabolique des protéines simples implique l'incorporation *in vivo* ou *in vitro* de leurs acides aminés constituants, dont au moins un qui comporte une ou des substitutions de tritium ou de carbone–14 en diverses positions ou le cas échéant, de soufre–35 dans la méthionine ou la cystéine. Les acides aminés nécessaires à cette fin sont disponibles commercialement. Les méthodes métaboliques permettent l'identification de produits de traduction pour fin d'étude, entre autres, de l'expression génétique et son contrôle ou de la localisation et l'assemblage de diverses structures cellulaires ou virales.

Le radiomarquage enzymatique ou chimique, d'autre part, s'applique aux protéines disponibles *a priori* et permet, lors de méthodes expérimentales subséquentes, de les suivre spécifiquement même à l'état de traces. Ces marquages se font le plus souvent avec les radio-isotopes de l'iode. Les méthodes de radio-iodation se subdivisent en méthodes directes et indirectes ou de conjugaisons. Dans les méthodes directes, l'iodure cationique oxydé est directement mono ou di-substitué dans l'anneau phénolique de la tyrosine en position ortho au groupe hydroxyl. Dans des conditions plus alcalines que celles habituellement employées, l'histidine et la tryptophane sont également iodurés. Dans les méthodes indirectes, des réactifs iodurés sont conjugués aux protéines à divers sites de condensation, dans des conditions généralement moins dénaturantes que les conditions d'iodation directe.

Les méthodes directes sont simples et efficaces. Toutefois, elles ne peuvent êtres utilisées qu'avec des peptides contenant les résidus d'acides aminés iodurables: tyrosine, histidine, et/ou tryptophane. De plus les agents oxydants et réducteurs employés peuvent théoriquement altérer la structure tertiaire et l'activité biologique de certaines protéines, car le tryptophane, la méthionine et la cystéine sont particulièrement sensibles à l'oxydation et les ponts disulfures à la réduction. En pratique, la concentration de ces agents et la durée d'incubation est telle qu'il y a peu de dénaturation. Enfin, certaines protéines, riches en groupes thiols réducteurs ne se prêtent pas à l'iodation directe parce que leur capacité réductrice inhérente inhibe l'indispensable oxydation de l'iodure.

Les méthodes de radio-iodation par conjugaison sont plus douces que les méthodes directes du point de vue chimique et radiologique. Des réactifs ayant une activité spécifique en excès de 75 TBq/mmol sont disponibles commercialement pour cet usage. Il est également possible de réaliser soi-même en laboratoire le marquage du réactif de conjugaison par une des méthodes directes. Avec certains peptides dépourvus d'acides aminés iodurables, une stratégie possible consiste à y introduire le conjugué non-marqué de manière à constituer un stock de matériel stable et homogène pour marquage par méthode directe au besoin. Notons, enfin, que des réactifs de conjugaison sont également disponibles pour l'introduction de radio-isotopes autres que l'iode dans les protéines dont, par exemple, l'ester de N–hydroxysuccinimidyl t–butoxycarbonyl-L–[$^{35}$S] méthionine, le dicyclohexyl [$^{14}$C] carbodiimide et le N–Succinimidyl [2, 3–$^{3}$H] propionate.

L'iode est toujours un marqueur externe des protéines de sorte que leur structure s'en trouve inévitablement modifiée. Indépendamment de la méthode de marquage employée, un empêchement stérique dans ou près d'un site actif, d'un récepteur ou d'un déterminant quelcon-

que peut entraîner une modification dans les propriétés biologiques et/ou biophysiques d'une protéine marquée. Dans cette éventualité, il est généralement possible de sélectionner un autre réactif de conjugaison ayant un site de réaction agissant à des sites différents sur la protéine et permettant de conserver intactes les propriétés à l'étude.

Certaines des méthodes d'iodation des protéines sont à caractère vectoriel puisqu'elles marquent préférentiellement les tyrosines stériquement accessibles à la surface de membranes ou de structures tridimensionelles, le cas échéant. Les méthodes en phase solide (Enzymobeads, Iodobeads, Iodo–Gen), à la lactoperoxidase et à l'acide iodosulfanilique sont parmi celles-ci. Toutefois, elles ne sont pas réservées exclusivement à cette fin.

Dansd les méthodes de radio-iodation, les protéines sont exposées à la radiolyse par contact avec l'iode radioactif aussi bien en cours de marquage que pendant le stockage subséquent. Elles sont graduellement hydrolysées en partie par interaction directe avec les rayons gamma, mais surtout par l'action des produits de radiolyse de l'eau. D'autre part, les protéines sont exposées à la dénaturation suite à leur dilution excessive en cours de marquage ou, en l'absence de précautions appropriées, par contact avec la solution alcaline d'[$^{125}$I] iodure de sodium dissous dans l'hydroxyde de sodium.

Les protéines iodurées tendent à se polymériser de même qu'à adhérer aux surfaces de verre et de plastique. Il y a lieu de prendre certaines précautions pour contrôler ces problèmes. Les protéines devraient êtres marquées à la plus faible radioactivité compatible avec la détection efficace dans l'application envisagée. Pendant le marquage, la radioactivité et sa durée de contact avec la protéine devraient être les plus réduites possible. La solution d'iodure–125 devrait être tamponnée avant usage. Une solution de protéine porteuse devrait être ajoutée après l'arrêt de la réaction d'iodation de façon à absorber les radiations, neutraliser les produits de radiolyse de l'eau, stabiliser la protéine iodurée diluée et bloquer son adhésion au verre et au plastique. Un iodure de sodium ou de potassium non-radioactif devrait également être ajouté à l'étape d'isolement de la protéine marquée pour déplacer le radio-iodure faiblement lié à la protéine par des liens électrostatiques.

Les protéines marquées sont généralement isolées par chromatographie sur une colonne de Sephadex G–25. Le choix du tampon d'élution n'est pas critique mais doit préférablement contenir une protéine et un iodure porteur. Le volume de la colonne devrait être au moins dix fois plus grand que le volume de l'échantillon à traiter. Le premier pic radioactif élué contient les protéines marquées et le second contient l'iodure libre.

Le degré d'incorporation d'iode radioactif dans la protéine peut être évalué à partir des données recueillies à l'étape de filtration sur gel. Sachant que l'iodure libre ne s'adsorbe pas aux surfaces de verre et de plastique il s'en suit que les pertes de radioactivité sont attribuables à l'adsorption de protéines marquées. Si une quantité précise de radioactivité est utilisée pour le marquage, la quantité incorporée se calcule en soustrayant la radioactivité du pic d'iodure libre de la radioactivité initiale. Connaissant la masse de protéine employée, on peut également calculer l'activité spécifique de la protéine marquée. Enfin, le rendement en protéines marquées est le rapport de la radioactivité comptée dans le pic de protéines sur la radioactivité incorporée selon les calculs précédents.

### 3.1. MARQUAGE *IN VIVO*

Le radiomarquage métabolique de protéines virales permet l'étude de la localisation, la structure et l'assemblage des constituants viraux en cour d'infection. Des techniques d'isolement de cellules et de sous-fractions cellulaires en combinaison avec des méthodes d'électrophorèse en deux dimensions en gels de polyacrylamide permettent la mise en évidence de protéines d'origine virale ou cellulaire apparaissant en cour d'infection. Divers précurseurs radioactifs peuvent êtres employés dont les acides aminés marqués au tritium, carbone–14, ou les acides aminés sulfurés marqués au soufre–35. Les glycoprotéines peuvent par surcroît être marquées avec des monosaccharides radio-actifs et les phosphoprotéines avec le phosphore–32 inorganique (Anderson 1983). La [$^{35}$S]–méthionine est l'acide aminé radioactif le plus utilisé pour le marquage métabolique. Nous présentons à titre d'exemple plus détaillé les conditions expérimentales pour le marquage *in vivo* d'un antigène tumoral de SV40 de nature phosphoprotéique. La localisation subcellulaire de l'antigène tumoral (T–ag) fut étudiée dans les lignées de cellules transformées de hamster (H–50) et de souris (VLM) de même que dans les cellules normales de reins de singes (TC–7) infectées par SV40: en solubilisant à partir de fractions nucléaires, d'une part, et de membranes cellulaires, d'autre part, les protéines marquées avec [$^{35}$S] méthionine ou [$^{32}$P] inorganique, en les immunoprécipitant avec un sérum anti–(T–ag) puis en les analysant par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

**Méthode**

1. Effectuer les marquages avec la [$^{35}$S] méthionine ou avec le [$^{32}$P] inorganique sur des cultures en bouteille (1–2 x $10^8$ cellules/ bouteille) soit de cellules TC–7, 48 h post-infection avec SV40 ou de cellules H–50 ou VLM transformées par SV40, 48 h post-ensemencement.

2a. **Incorporation de [$^{35}$S] méthionine**

Incuber les cellules pendant 2 h à 37°C dans le milieu minimal essentiel de Eagle (MEM, base de Eagle) sans méthionine et enrichi de 2% de sérum de fœtus de veau (SFV) dialysé. Marquer les cellules en incubant pendant 2 h en présence de 5 mL de MEM sans méthionine enrichi de 2% de SFV dialysé contenant 10 MBq de [$^{35}$S] méthionine.

2b. **Incorporation de [$^{32}$P] inorganique**

Incuber les cellules pendant 16 h à 37°C dans le MEM sans phosphate enrichi de 5% de sérum foétal bovin dialysé. Ensuite incuber les cellules pendant 2.5 h dans 10 mL de MEM sans phosphate enrichi de 5% de SFV dialysé contenant 100 MBq de [$^{32}$P] inorganique.

### 3.2. TRADUCTION *IN VITRO*

Divers systèmes acellulaires prokaryotes et eukaryotes permettent la traduction *in vitro* avec incorporation de précurseurs marqués. Un système bactérien de transcription-traduction couplé, préparé à partir d'*E. coli*, permet la synthèse de protéines résultant de l'expression d'ADN cloné. Des systèmes eucaryotes à base de réticulocytes de lapin ou de germe de blé permettent la traduction d'ARN messager ou tout autre ARN–poly(A).

Plusieurs protéines pré-sécrétoires se terminent à l'extrémité N–terminale par une séquence de 15 à 30 acides aminés à caractère hydrophobe désignée peptide signal. Ces peptides peuvent être scindés par les peptidases associées aux membranes microsomales. Cette opération est concomitante en présence de celles-ci mais peut être réalisée à posteriori en présence d'extraits de ces membranes au détergent. L'hydrolyse du peptide signal peut être mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS par une augmentation de mobilité. Des trousses de traduction de même que des préparations de membranes microsomales avec mode d'emploi sont disponibles commercialement. À titre indicatif nous présentons néanmoins la préparation et l'emploi d'un système acellulaire à base de germe de blé avec inclusion de membranes microsomales.

**Méthode**

*Préparation d'un extrait de germe de blé–S23*

1. Broyer dans un mortier froid 1.5 g de germes de blé frais dans 10 mL d'une solution $Mg(CH_3COO)_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 2 mM et KCl 90 mM.

2. Centrifuger l'extrait pendant 10 min à 23 000 x g et prélever le surnageant dégagé de la couche lipidique et du culot.

3. Tamponner l'extrait à 20 mM Tris–acétate, pH 7.6 et ajuster la concentration d'acétate de magnésium à 2 mM puis centrifuger à nouveau.

4. Equilibrer le surnageant sur une colonne de Sephadex G–25 1.5 x 25 cm contre une solution contenant:

   Tris–acétate pH 7.6 ..... 1 mM

   KCl ..... 50 mM

   $Mg(CH_3COO)_2$ ..... 1 mM

   β–mercaptoéthanol ..... 4 mM

5. Combiner les fractions turbides et centrifuger pendant 10 min à 23 000 x *g*. Conserver l'extrait S23 en aliquots à –80°C jusqu'à usage.

*Préparation de membranes microsomales*

6. Centrifuger le surnageant post-mitochondrie (10 000 x *g* 10 min) de tissus pancréatiques de chien à 180 000 x *g* pendant 1 h.

7. Homogénéiser le culot de membranes microsomales dans un tampon triéthanolamine–HCl 50 mM pH 7.5 , et ajuster la concentration de l'extrait à 50 unités $A_{280}$/mL.

8. Ajouter un volume égal du même tampon contenant de l'EDTA 20 mM. **Centrifuger pendant 1 h à 100 000 x *g* sur un coussin de saccharose 0.5 M** dans un tampon triéthanolamine–HCl 50 mM pH 7.5, contenant 50 mM de KCl.

9. Resuspendre le culot à une concentration finale de 50 unités $A_{280}$/mL dans un tampon triéthanolamine–HCl 50 mM pH 7.5, contenant 50 mM de KCl et 2 mM de $MgCl_2$

10. Congeler les microsomes en aliquots dans l'azote liquide et conserver les à –80°C jusqu'à usage.

*Traduction*

11. Placer dans un microtube à 0–4°C, dans un volume de 100 µL, les éléments suivants:

Extrait de germe
de blé S23 ..... 20-40 µL

HEPES pH 7.5 à 20°C ..... 2 µL

KCl ..... 2 µmoles

$CH_3COOH$ ..... 11 µmoles

$(CH_3COO)_2$ Mg ..... 0.2 µmoles

Spermidine HCL, pH 7.5 ..... 8 nmoles

Dithiothréitol ..... 0.2 µmoles

ATP ..... 0.1 µmoles

GTP ..... 0.01 µmoles

Créatine phosphate ..... 0.8 µmoles

Créatine phosphokinase ..... 4 µg

[$^{35}$S] méthionine,
8 TBq/mmol. ..... 500 KBq

Les 19 autres acides aminés,
chacun ..... 2 nmoles

ARNm ..... 0.1 U $A_{250}$

Microsomes ..... 4.0 U $A_{280}$

12. Incuber pendant 90 min à 27°C. Les produits de traduction peuvent êtres précipités avec de l'acide trichloracétique ou spécifiquement par immunoprécipitation et analysés par électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS.

## 3.3. MARQUAGE ENZYMATIQUE *IN VITRO*

### 3.3.1. Lactoperoxidase

L'oxydation d'iodure et sa substitution dans la tyrosine peut être effectuée enzymatiquement par l'intermédiaire de la lactoperoxidase, en présence de faibles concentrations de peroxyde d'hydrogène. La réaction est initiée par l'addition de peroxide puis est entretenue par additions subséquentes à toutes les 7 minutes. Alternativement, le peroxyde peut être généré en quantités optimales de façon continue à partir de β–D–glucose par la β–D–glucose oxydase. En présence de concentrations optimales d'iodure, la réaction est vectorielle puisque les seuls résidus tyrosines accessibles à la surface tridimensionnelle de protéines, cellules ou virus, pour la formation de complexes enzyme-substrat sont marqués. La méthode est douce et peu dénaturante. Le milieu de réaction doit être exempt d'inhibiteurs enzymatiques ou d'agents réducteurs de type azide ou sulfhydryl respectivement. Dans certaines conditions, la lactoperoxidase est capable d'iodurer l'histidine. Le principal désavantage de cette méthode est que l'iode est inévitablement incorporé aussi bien dans la lactoperoxidase et la β–D–glucose oxydase que dans la protéine cible.

**Méthode**

*A. Par addition de peroxyde d'hydrogène*

1. Placer dans une éprouvette en polystyrène les réactifs:

[$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL ..... 10 µL

Tampon acétate de sodium
0.4 M, pH 5.6 ..... 20 µL

Protéine cible, 200–500 µg/mL
en tampon phosphate de
sodium 0.05 M, pH 7.5 ..... 10 µL

Lactoperoxydase, 2.5 µg/mL en
tampon acétate de sodium
0.1 M, pH 5.6 ..... 10 µL

Peroxyde d'hydrogène, 20
µg/mL fraîchement dilué ..... 10 µL

2. Incuber pendant 7 min à la température ambiante.

3. Ajouter après 7 min deux autres aliquots de 10 µL de peroxyde d'hydrogène.

4. Pour arrêter la réaction, fixer l'iodure avec 0.5 mL de tyrosine (2 mg/mL) en tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5.

5. Après 1 min, ajouter 0.42 mL de tampon contenant 2 mg/mL de NaI et 2 mg/mL de gélatine. Isoler la protéine marquée sur Sephadex G–25 en présence de gélatine 0.1%.

*B. Par génération de peroxyde d'hydrogène avec le système glucose-glucose oxydase*

1. Placer dans une éprouvette à 4°C:

Suspension de 4–6 x $10^6$ cellules dans du PBS contenant 20 mM de β–D–glucose ..... 1 mL

Lactoperoxidase ..... 3-6 mU

Glucose oxydase ..... 4-8 mU

[$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL ..... 1 µL

2. Sédimenter les cellules par centrifugation à 500 rpm pendant 10 min à 4°C. Reprendre le culot de cellules dans 20 mL de milieu minimal de Eagle (MEM) froid et recentrifuger.

3. Laver les cellules deux autres fois avec 20 mL de MEM froid.

### 3.3.2. Les Enzymobeads ™ (Bio–Rad)

Les Enzymobeads™ sont des billes hydrophiles de polyacrylamide de 1 µm auxquelles sont liées, de façon covalente, dans un rapport optimal, la lactoperoxidase et la glucose oxydase. La taille et la densité des billes assurent leur maintien en suspension homogène pour la durée de la réaction. Il est possible d'éliminer les problèmes liés à l'auto-iodation des enzymes par l'utilisation des Enzymobeads. La littérature contient plusieurs exemples de leur utilisation comportant des variantes dans les proportions des réactifs employés (Bolton 1986).

**Méthode**

1. Placer dans une éprouvette:

Protéine cible, 200 µg en tampon phosphate de sodium

0.2 M, pH 7.2 ..... 25 µL

[$^{125}$I] NaI, 4-15 MBq ..... 10 µL

Enzymobeads™ reconstituées ..... 25 µL

β–D–glucose 1% ..... 20 µL

2. Incuber le milieu pendant 15 min à 0°C. Arrêter la réaction avec 20 µL d'azoture de sodium 25 mM puis ajouter 1 mg/mL d'iodure et 1 mg/mL de gélatine et désaler la protéine marquée sur Sephadex G–25. Les Enzymobeads sont retenus sur la colonne. L'inhibiteur enzymatique, l'azoture de sodium, peut être omis si la protéine porteuse est ajoutée seulement après le désalage sur Sephadex G–25.

## 3.4. RADIO-MARQUAGE CHIMIQUE

### 3.4.1. Radio-iodation directe

#### 3.4.1.1. Monochlorure d'iode

La première méthode développée pour la substitution efficace d'iode dans les protéines est la méthode de McFarlane

(McFarlane 1958) employant le monochlorure d'iode. Le degré de substitution dépend de la concentration en monochlorure d'iode et peut être contrôlé précisément. Toutefois, l'incorporation dans les protéines d'iode non radioactif provenant du réactif étant inévitable, l'activité spécifique accessible par cette méthode est inférieure à celle qu'il est possible d'atteindre par les autres méthodes décrites. Le réactif s'avère généralement moins dénaturant que le chloramine–T.

### 3.4.1.2. Chloramine-T

Le chloramine–T est le plus utilisé des agents oxydants pour l'iodation directe des protéines. Ce sel de sodium de N–monochloro-p–toluène sulfonamide s'hydrolyse lentement en solution aqueuse et libère l'acide hypochloreux qui oxyde l'iodure anionique en iodure cationique.

**Méthode**

1. Placer dans une éprouvette:

   Protéine cible à 2–5 µg en tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5 ..... 10 µL

   Tampon phosphate de sodium 0.25 M, pH 7.5 ..... 10 µL

   [$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL ..... 10 µL

   Chloramine–T, 5 µg dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.5 (fraichement préparé) ..... 10 µL

2. Incuber pendant 10 min à la température ambiante, puis arrêter la réaction avec 100 µL d'agent réducteur (4.3 µg de cystéine dans un tampon phosphate 0.05 M, pH 7.5).

3. Ajouter 1 mL de la solution de porteurs (tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5 contenant 0.2 mg/mL de KI et 10 mg/mL d'albumine).

4. Désaler sur une colonne de Sephadex G–25.

### 3.4.1.3. Iodobeads ™ (Pierce)

Les Iodobeads™ sont des billes de polystyrène non-poreuses auxquelles sont liées de façon covalente des molécules de chloramine–T. Aucun agent réducteur n'est requis pour arrêter la réaction puisque les billes peuvent êtres retirées physiquement du milieu de réaction. La réaction d'iodation persiste toutefois pendant quelques minutes après le retrait des billes, compte tenu de l'accumulation d'iode oxydé. Il faut éviter d'ajouter une protéine porteuse avant épuisement de cet iode oxydé.

**Méthode**

1. Laver les Iodobeads avant usage avec deux aliquotes de 1 mL de PBS et assécher les sur un papier filtre.

2. Placer dans une éprouvette:

   Protéine cible, 100 µg dans du PBS ..... 0.5 mL

   [$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL ..... 10 µL

   Iodobeads ..... 1 bille

3. Incuber pendant 15 min à la température ambiante. Transférer le mélange sans la bille à une seconde éprouvette. Rincer la première éprouvette et la bille avec 1 mL de PBS.

4. Ajouter 0.5 mole de NaI porteur au mélange de réaction et de rinçage, puis désaler sur une colonne de Sephadex G–25.

### 3.4.1.4. Iodo–Gen™

Le 1,3,4,6–tetrachloro-3α,6α–diphényl-glycouracile (Iodo–Gen™) est un agent oxydant, virtuellement insoluble dans l'eau, qui peut être déposé sur des parois de verre à partir de solutions organiques. Les couches minces de réactif ainsi obtenues permettent l'iodation en phase solide de protéines. Les tubes de réaction préparés à l'avance peuvent être conservés indéfiniment dans un dessicateur contenant un agent dessicant. Le marquage est efficace dans une variété de tampons entre pH 5.5 et 9, le choix étant dicté par la stabilité de la protéine cible.

**Méthode**

1. Dissoudre l'Iodo–Gen (100 µg/mL) dans le chloroforme, le chlorure de méthylène ou le diméthyl sulfoxyde.

2. Placer des aliquotes de 100 µL dans des éprouvettes de 12 x 75 mm, puis assécher sous un courant d'azote sec à la température ambiante.

3. Conserver les récipients de réaction dans un dessicateur jusqu'à usage. Des récipients de diverses dimensions peuvent être préparés au besoin.

4. Placer dans le récipient de réaction préalablement rincé avec le tampon:

   Protéine cible, 1 mg/mL .....100 µL

   [$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL .....5 µL

5. Incuber la réaction pendant 15 min à la température ambiante.

6. Retirer le contenu du récipient de réaction et ajouter 100 µL de tampon contenan NaI 0.5 M et 2% d'albumine.

7. Isoler la protéine marquée sur une colonne de Sephadex G–25.

### 3.4.2. Radio-marquage indirect

### 3.4.2.1. Réactif de Bolton–Hunter

Le réactif de Bolton–Hunter, N–succinimidyl 3–(4–hydroxyphényl) propionate (NSHPP), se condense aux protéines par acylation des groupes aminés primaires libres des lysines et acides aminés N–terminaux. Le réactif est disponible commercialement, soit à l'état radioioduré ou pouvant l'être subséquemment en laboratoire. Les albumines qui sont fréquemment employées comme protéines porteuses dans l'isolement de protéines marquées ont une affinité pour les réactifs aromatiques de conjugaison. La gélatine est donc employé à cet effet plutôt que le sérum bovin ou l'albumine sérique bovine en présence de réactifs aromatiques.

**Méthode**

*Préparation de NSHPP*

1. Dans un tube conique de 10 mL à bouchon rodé, placer 10 µL de NSHPP, 40 µg/mL de toluène: éthyle acétate (1:1 v/v) et assécher sous un courant d'azote sec.

2. Ajouter promptement sous agitation (le NSHPP étant instable):

   [$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL .....20 µL

   Chloramine–T, 5 mg/mL en tampon phosphate de sodium 0.25 M, pH 7.5.....10 µL

   Métabisulfite de sodium, 12 mg/mL en tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5.....10 µL

NaI ou KI (200 mg/mL) .....10 µL

Diméthylformamide.....2 µL

Benzène redistillé.....250 µL

3. Mélanger avec un agitateur Vortex pour extraire le [$^{125}$I] NSHPP dans le benzène. Transférer le benzène dans un second tube conique, puis répéter l'extraction de la phase aqueuse avec deux autres aliquots de 250 µL de benzène.

4. Assécher le mélange des extraits au benzène avec un courant d'azote sec.

5. Concentrer le résidu de réactif ioduré en rinçant les parois du tube avec un minimum de benzène puis, en asséchant de nouveau.

6. Ajouter à 40 MBq de [$^{125}$I) NSHPP sec, 10 µL de protéine cible dissoute dans un tampon borate 0.1 M, pH 8.5, puis incuber la réaction pendant 30 min à 0°C.

7. Neutraliser la réaction avec 0.5 mL de glycine 0.2 M (un amine primaire) dans le tampon borate.

8. Incuber 5 min additionnelles à 0°C puis ajouter 1 mL de tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5, contenant 2.5 mg de gélatine.

9. Isoler la protéine conjuguée sur Sephadex G–25.

### 3.4.2.2. Réactif de Wood

Le réactif de Wood, méthyl p–hydroxybenzimidate (MPHBIM) se condense sélectivement sur les groupes ε–amino de la lysine pour former des liens amidine protonés. La méthode a l'avantage de ne pas modifier la charge de la protéine marquée, ce qui n'est pas le cas de la méthode Bolton–Hunter ou même des méthodes d'iodation directes qui modifient la charge des protéines en changeant le pKa du phénol tyrosinique. Le réactif est plus stable en solution aqueuse que le réactif Bolton–Hunter. Il est disponible commercialement non-ioduré ou ioduré.

**Méthode**

1. Placer dans une éprouvette en polypropylène de 1.5 mL:

   MPHBIM, 73 µg/mL de borate de sodium 0.05 M, pH 8 .....5 µL

   Chloramine–T, 15 mg/mL de tampon phosphate de sodium 0.25 M, pH 7.5.....5 µL

   [$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL .....10 µL

2. Mélanger pendant 5 sec sur un agitateur Vortex puis ajouter:

   Sodium métabisulfite, 20 mg/mL de diméthylformamide 10% (v/v) .....5 µL

   Benzène redistillé.....250 µL

3. Faire la triple extraction du réactif marqué tel que décrit pour le réactif Bolton-Hunter.

4. Au réactif de conjugaison séché [$^{125}$I] MPHBIM, ajouter 10 µL de protéine cible 0.5 mg par mL de tampon borate 0.1 M, pH 8.5 puis incuber pendant 24 h à la température ambiante.

5. Arrêter la réaction avec 4 µL de $NH_4HCO_3$ 2 mM.

6. Après 5 min, ajouter 1 mL de tampon phosphate de sodium 0.05 M, pH 7.5, contenant 2.5 mg de gélatine.

7. Isoler la protéine conjuguée sur Sephadex G–25.

### 3.4.2.3. Acide diiodosulfanilique diazoté

L'acide diiodosulfanilique a une taille et une polarité telles qu'il ne pénètre pas les membranes lipidiques. Il est donc recommandé pour les radiomarquages de surface de cellules et virus. L'acide [$^{35}$S] sulfanilique a été le premier dérivé de l'acide sulfanilique employé à cette fin. L'emploi à faible concentration et haute activité spécifique du réactif permet la réalisation de marquages sans perte de fonctions membranaires. Le réactif, comme les autres composés di–azotés, se condense aux groupes tyrosines, histidines et lysines des protéines cibles. Il peut être employé au même titre que les autres réactifs de conjugaison pour réaliser le marquage non-vectoriel de protéines solubles. L'acide [$^{125}$I] di-iodosulfanilique est disponible commercialement.

**Méthode**

1. Assécher l'acide [$^{125}$I] diiodosulfanilique, 4 MBq à 60 TBq/mmol en évaporant le solvant n–propanol: eau (1:1, v/v) sous un courant d'azote et reprendre immédiatement dans 10 µL d'eau froide. Le réactif s'autoradiolyse rapidement à l'état sec.

2. Ajouter au réactif dans un bain de glace, 5 µL de nitrite de sodium 50 mM et 5 µL de HCl 0.1 N.

3. Incuber la réaction pendant 5 min à 0°C, puis neutraliser avec 80 µL de tampon phosphate de sodium 0.1 M, pH 7.5.

4. A 5°C, ajouter le réactif diazoté à la suspension cellulaire ($5x10^6$ cellules/mL) préalablement lavée 10 fois au PBS, pH 7.5.

5. Après 15 min d'incubation, centrifuger la suspension 5 min à 500 x *g* et décanter le surnageant.

6. Laver les cellules 6 fois au PBS froid contenant 1% d'albumine.

Certains types de cellules (e.g. érythrocytes) se marquent plus lentement que d'autres. Dans de tels cas la période d'incubation doit être prolongée, et l'hydrolyse du sel diazonium peut devenir appréciable et peut réduire l'incorporation du marqueur. Cet effet peut être contrôlé par l'addition d'acide diiodosulfanilique non radioactif avant la diazotation pour assurer une concentration finale d'acide diiodosulfanilique diazoté de $10^{-4}$ M pendant le marquage cellulaire.

### 3.4.2.4. Acide N–hydroxysuccinimidyl-4–azidosalicilique (ANHS–AS)

Ce réactif hétérobifonctionel iodurable est employé dans des méthodes de marquage par affinité pour lier de façon covalente, après photoactivation aux UV longs, divers ligands macromoléculaires. Ainsi l'enzyme, l'anticorps, lectine ou autre récepteur couplé au réactif radioioduré, après s'être lié spécifiquement à son substrat, s'y attache après exposition aux UV longs de manière à former un pont covalent radioactif avec celui-ci.

**Méthode**

1. Placer dans une éprouvette:

   ANHS–AS
   2 mM dans l'acétone.....100 µL

   [$^{125}$I] NaI, 20 GBq/mL .....2 µL

Chloramine–T
200 µg dans l'acétone .....20 µL

2. Isoler le réactif marqué par chromatographie en couche mince sur gel de silice G en développant avec benzène: chloroforme: acétate d'éthyl: acide acétique (1:1:1:0.1, v/v).

3. Préparer une solution 100 mM de [$^{125}$I] ANHS–AS dans le diméthyl sulfoxyde, puis diluer 1:500 avec PBS, pH 7.4.

4. Placer dans une éprouvette:

[$^{125}$I] ANHS–AS 0.2 mM.....50 µL

Protéine cible,
10 µg dans le PBS, pH 7.4.....50 µL

5. Incuber la réaction pendant 30 min à 25°C, puis isoler la protéine marquée sur Sephadex G–25.

### 3.4.3. Marquage au tritium

Les protéines tritiées, ayant une longue demi-vie et une grande stabilité radiochimique peuvent s'avérer préférables aux protéines radio-iodurées pour certaines applications. L'acétylation et la méthylation réductrices sont deux méthodes disponibles pour tritier les protéines sur les groupes ε-amino des lysines. Les exemples suivants traitent de la tritiation de la protéine A de *Staphylococcus aureus*.

**Méthode**

*Acétylation*

1. Placer dans une éprouvette:

Protéine A, 5 mg en tampon phosphate de sodium 0.3 M, pH 7.2 .....0.45 mL

[$^{3}$H] anhydride acétique, 10 µmoles à 1 TBq/mmol. .....1 GBq

2. Incuber la réaction pendant 2 h à la température ambiante et isoler la protéine A tritiée sur Sephadex G–25.

*Méthylation*

3. Placer dans une éprouvette:

Formaldéhyde 3.7% .....0.5 mL

Protéine A, 10 mg en tampon borate, pH 9 .....1.0 mL

[$^{3}$H] $NaBH_4$, 100 GBq/mL en NaOH 0.1N, 2 TBq/mmol .....0.3 mL

4. Incuber la réaction pendant 30 min à 4°C et isoler la protéine A tritiée sur Sephadex G–25.

### 3.4.4. Marquage avec les radionucléides métalliques

Un agent chélateur fort, tel que l'acide diéthylène triamine penta-acétique (ADTP), peut être conjugué à la lysine des protéines de sorte qu'un radionucléide métallique peut y être lié. Cette approche est employée principalement avec les anticorps monoclonaux pour usage diagnostique dans les techniques d'imagerie et l'indium–111 est souvent employé. Puisque ces conjugués peuvent être radio-marqués immédiatement avant usage, ils ne subissent ni radiolyse ni désintégration radioactive pendant l'entreposage. De plus, ceux-ci sont plus stables *in vivo* et donnent une meilleure imagerie que les anticorps radioiodurés.

**Méthode**

1. Dans une éprouvette contenant 0.7 à 0.9 µg d'ADTP solide, placer 20 µL de solution protéine cible 1.5% en tampon bicarbonate de sodium 0.05 M, pH 7.

2. Après 1 min, isoler le conjugué sur une colonne de Sephadex G–25 élué avec HEPES 0.05 M, NaCl 0.15 M contenant 20 mg/mL d'albumine.

3. Chélater le conjugué avec 25-100 KBq d'indium-111/µg de conjugué immédiatement avant usage et désaler sur Sephadex G–25.

## 4. POLYSACCHARIDES

Les polysaccharides et les portions oligosaccharidiques de glycoprotéines constituent une troisième famille de macromolécules biologiques dont le radiomarquage trouve des applications en virologie. Le marquage peut s'effectuer *in vivo* par incorporation de monosaccharides radioactifs ou par des méthodes chimiques. L'iodation d'oligosaccharides peut être réalisés en générant des groupes 1–amino-1–déoxyalditols par amination réductrice suivie d'acylation avec le réactif BoltonHunter. La tritiation, d'autre part, est possible par réduction au borohydrure de sodium tritié.

Le développement de multiples techniques immunologiques et de trousses diagnostiques basées sur la technologie des anticorps monoclonaux motive la recherche de méthodes non-dénaturantes pour le marquage des immunoglobulines. Toutes les classes d'immunoglobulines sont des glycoprotéines dont les portions oligosaccharidiques ne sont pas directement impliquées au niveau des sites anticorps de sorte que l'introduction d'un marqueur à ce niveau est moins susceptible d'en affecter l'affinité que le marquage externe d'acides aminés.

Le marquage nécessite la génération de résidus aldéhydiques par oxydation periodique suivie de la condensation d'un marqueur à caractère nucléophile de type amine ou hydrazide. Les conditions de l'oxydation periodique peuvent être ajustées pour être spécifiques au carbone C–7 exocyclique des résidus d'acide sialique, laissant ainsi intact les acides aminés. Une molécule signal radioactive ou chélatante pour les métaux radioactifs peut être conjuguée par le biais d'un résidu aminé aux groupes aldéhydes générés. La base de Schiff résultante est enfin stabilisée par réduction au cyanoborohydrure ou au borohydrure de sodium. Des molécules signal avec le groupe réactif hydrazide ont été employées, mais pas avec un radiomarqueur. Ces derniers auraient l'avantage de réduire le risque de formation fortuite de bases de Schiff inter ou intramoléculaires. De plus, aucune étape de réduction au cyanoborohydrure n'est requise avec les hydrazones formés.

**Méthode**

*Oxydation periodique*

1. Placer dans une éprouvette sur la glace:

   Immunoglobulines .....50 mg

   Periodate de sodium 10-30 mM en tampon phosphate de sodium 10 mM, pH 6, chlorure de sodium 0.15 M.....2.5 mL

2. Incuber pendant 1 h à l'abri de la lumière, puis désaler sur Sephadex G–25 en éluant avec du PBS.

*Radio-ioduration*

3. Iodurer la tyrosine du peptide synthétique glycyl-tyrosyl-glycyl-glycyl-arginine avec l'iode–125 par la méthode chloramine–T.

4. Incuber 1000 moles du peptide marqué par mole d'immunoglobulines modifiées, pendant 1 h à la température ambiante.

5. Ajouter le cyanoborohydrure de sodium à 10 mM (concentration finale) et incuber pendant 4 h.

6. Isoler la protéine marquée sur Sephadex G–25.

*Radio-marquage à l'indium-111*

7. Incuber 1000 moles, soit d'acide glycyl-tyrosyl-lysyl-diéthylène-triamine penta-acétique ou d'acide p–aminoaniline diéthylène-triamine-penta-acétique par mole d'immunoglobulines modifiées pendant 1 h à température ambiante.

8. Effectuer la réduction au cyanoborohydrure de sodium 10 mM et désaler sur Sephadex G–25.

9. Ajouter immédiatement avant usage 100 KBq d'indium–$^{111}$/µg de conjugué et désaler sur Sephadex G–25.

## 5. LIPIDES

Les lipides complexes des membranes cellulaires et virales constituent une autre classe de macromolécules biologiques pour laquelle des méthodes de radiomarquage peuvent être utiles. Une sélection de précurseurs marqués au tritium ou au carbone–14 est disponible commercialement pour incorporation *in vivo*. Il est possible, d'autre part, de marquer les lipides à l'iode radioactif par l'intermédiaire de la lactoperoxidase. La méthode permet de marquer les phospholipides, les lipides neutres et les acides gras libres, saturés ou insaturés. A titre d'exemple, on retrouve 32% de l'iode incorporé dans les cellules tumorales lignée–10 par iodation à la lactoperoxydase dans les lipides membranaires. La méthode peut également servir à iodurer les liposomes.

**Méthode**

1. Placer dans une éprouvette:

   Liposomes (500 µg de lipides)
   ou cellules lavées (5 x $10^6$)
   dans le PBS ..... 0.4 mL

   Lactoperoxydase ..... 10 µg

   Glucose oxydase ..... 3 mU

   β–D glucose 25 µM ..... 50 µL

   [$^{125}$I] NaI, 4 GBq/mL ..... 4 MBq

   PBS à ..... 0.5 mL

2. Incuber la réaction pendant 15 min à la température ambiante, puis laver les cellules ou les liposomes 5 fois dans le PBS.

## 6. RÉFÉRENCES

Anderson, N.G. 1983. High-resolution protein separation and identification methods applicable to virology. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 104: 197-217.

Bolton, A.E. 1977. *Radioiodination Techniques*. The Radiochemical Center, Amersham, England. Review 18.

Bolton, A.E. 1986. Comparative methods for the radiolabeling of peptides. Meth. Enzymol. 124: 18–29.

Bolton, A.E., et Hunter, W.M. 1973. The labeling of proteins to high specific radiactivities by conjugation to a $^{125}$ I-containing acylating agent. Biochem. J. 133: 529–538.

Efstratiadis, A., Maniatis, T., Kafatos, F.C., Jeffrey, A., et Vournakis, J.N. 1975. Full length and discrete partial reverse transcripts of globin and chorion mRNAs. Cell 4: 367–378.

Gaastra, W., et Josephsen, J. 1984. Radiolabeling of DNA with the Klenow fragment of DNA polymerase. Meth. Mol. Biol. 2: 263-268.

Huang, E.S., et Pagano, J.S. 1977. Nucleic acid hybridization technology and detection of proviral genomes. Meth. Virol. 6: 457–497.

Langone, J.J. 1980. Radioiodination by use of the Bolton-Hunter and related reagents. Meth. Enzymol. 70: 221–247.

Langone, J.J. 1980. $^{125}$I-labeled protein A: Reactivity with lgG and use as a tracer in radioimmunoassays. Meth. Enzymol. 70: 356-375.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., et Sambrook, J. 1982. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor.

Manley, J.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A. et Gefter, M.L. 1980. DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77: 3855–3859.

Markwell, M.A.K. 1979. *Radio-iodination of proteins and peptides using Iodo-Gen.* Protein Digest 3: 28–30. (Pierce Chemical Co.)

Markwell, M.A.K. 1982. A new solid-state reagent to iodinate proteins: 1. Conditions for the efficient labeling of antiserum. Anal. Biochem. 125: 427-432.

McConahey, P.J., et Dixon, F.G. 1980. Radioiodination of proteins by the use of the chloramine-T method. Meth. Enzymol. 70: 210-213.

McFarlane, A.S. 1958. Efficient trace-labeling of proteins with iodine. Nature 182: 53.

Rodwell, J.D., Alvarez, V.L., Lee, C., Lopes, A.D., Goers, J.W.F., King, H.D., Powsner, H.J., et McKearn, T.J. 1986. Site-specific covalent modification of monoclonal antibodies: *In vitro* and *in vivo* evaluations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83: 2632–2636.

Shaw, J.E., Huang, E–S. , et Pagano, J.S. 1975. Iodination of herpesvirus nucleic acids. J. Virol. 16: 132–140.

Symington, J., Green, M., et Brackmann, K. 1981. Immunoautoradiographic detection of proteins after electrophoretic transfer from gels to diazo-paper: Analysis of adenovirus encoded proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 177–181.

Zubay, G. 1973. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. Ann. Rev. Gen. 7: 267 287.

# 20

# IDENTIFICATION DES PROTÉINES VIRALES PAR IMMUNOPRÉCIPITATION

Michel Trudel et Pierre Payment

## 1. INTRODUCTION

L'identification et l'analyse de protéines virales marquées radioactivement ($^{125}I$, $^{35}S$, $^{32}P$, $^{14}C$ ou $^{3}H$), à partir de lysats ou de surnageants de cellules infectées, s'effectuent sur gel de polyacrylamide, après précipitation sélective par un sérum ou un anticorps monoclonal spécifique: la procédure est généralement identifiée sous le nom d'immunoprécipitation. Par la suite, les protéines virales sont révélées par autoradiographie dans le cas des émetteurs gamma ($^{131}I$ et $^{125}I$) et bêta ($^{32}P$) de haute énergie et par fluorographie dans le cas des émetteurs bêta de faible énergie ($^{35}S$, $^{14}C$ et $^{3}H$). En anglais, on réfère à la technique d'immunoprécipitation sous le nom de RIPA pour "Radio Immune Precipitation Assay". Cette technique, relativement récente, est dérivée des principes de précipitation sérologique qui ont cours en virologie depuis plus de vingt ans. Les utilisateurs éventuels sont invités à consulter la revue de Goding (1983) qui contient un guide détaillé de la méthode et celle de Ohara et al. (1985) dans laquelle l'on compare l'efficacité d'une dizaine de tampons couramment utilisés en immunoprécipitation. Pour la section autoradiographie et fluorographie, nous vous référons aux articles de Bonner et Laskey (1974), Laskey et Mills (1975 et 1977) et Swanstrom et Shank (1978).

## 2. MÉTHODE

La méthode que nous utilisons couramment dans nos laboratoires (voir représentation schématique, Figure 1) tire avantage de l'affinité de la protéine A de *Staphylococcus aureus* pour le fragment Fc des IgG de mammifères (Kessler, 1981). Les conditions expérimentales utilisées présentent quelques petites modifications de la méthode proposée par Norrby *et al.*(1981), tandis que l'électrophorèse est effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Bien que nous utilisons couramment l'équipement de la compagnie Bio-Rad (Mississauga, Ont., Canada), l'équipement vendu par Pharmacia (Uppsala, Suède) ou Hoefer Scientific (San Francisco, Ca, USA) sont tout aussi satisfaisants.

**Solutions**

*Tampon RIPA*

| | |
|---|---|
| Tris-HCl pH 7.4 | 0.10 M |
| NaCL | 0.15 M |
| KCl | 0.60 M |
| $MgCl_2$ | 5 mM |
| Triton X-100 | 2% |
| SDS | 0.1% |
| PMSF (phenylmethylsulfonyl-fluoride) | 1 mM |
| Trasylol Aprotinin | 100 U/mL |

Dans plusieurs cas, il est préférable de ne pas utiliser le détergent SDS qui altère la structure tridimensionnelle des protéines et la rend méconnaissable par certains anticorps monoclonaux en particulier.

*Tampon dissociant et réducteur*

| | |
|---|---|
| $H_2O$ | 4.7 mL |
| Tris-HCl (0.5 M, pH 6.8) | 1.0 mL |
| Glycérol | 1.0 mL |
| SDS (10% p/v) | 1.0 mL |
| 2-mercaptoéthanol | 0.1 mL |
| Bleu de bromophénol (0.05%) | 0.2 mL |

Si le 2-mercaptoéthanol est omis, les ponts disulfures seront conservés et le tampon sera un tampon dissociant, non réducteur.

**Méthode**

1. Dans un microtube de 1.5 mL, mettre en contact 50 µL de Protéine-A-Sepharose Cl-4B (0.28 g/1.5 mL; Pharmacia, Uppsala, Suède) avec 10 µL de sérum convalescent ou de liquide d'ascite ou 200 µL de surnageant d'hybridome.

2. Les immunoglobulines sont adsorbées à la protéine A durant 2 h à 37°C, sous agitation constante à l'aide d'un appareil agitateur.

3. Après déposition au culot par centrifugation avec la centrifugeuse Beckman J6 à 500 rpm (rotor 4.2) durant 5 min, les immunobilles (protéine A + anticorps) sont lavées trois fois avec 1 mL de tampon RIPA avec agitation au Vortex durant 30 sec.

4. Les lysats cellulaires ou les surnageants concentrés de cellules infectées, dont les protéines sont marquées radioactivement, sont solubilisés par traitement avec le tampon RIPA (2:1 v/v).

5. La suspension est ensuite clarifiée par ultracentrifugation à 25 000 rpm durant 45 min (Beckman, rotor SW 50.1). Le surnageant est récolté et utilisé pour l'immunoprécipitation.

6. Les immunobilles sont mises en contact avec 100 µL (environ 50 000 cpm) d'échantillons viraux.

7. L'incubation est effectuée à 37°C durant 2 h sous agitation constante.

8. Suivent trois lavages successifs par centrifugation dans du tampon RIPA (500 rpm, 5 min).

9. Le culot contenant les protéines virales immunoprécipitées est resuspendu dans du tampon dissociant pour électrophorèse et chauffé à 100°C durant 5 min. avant d'être chargé dans les puits d'électrophorèse.

10. Pour l'électrophorèse, nous utilisons un gel de polyacrylamide de 3% p/v comme gel de regroupement et un gel de 12% comme gel de séparation. Afin de déterminer le temps d'exposition, un comptage en scintillation liquide est effectué (5 µL d'échantillon pour 10 mL d'Aquasol).

**Dans le cas des émetteurs radioactifs de haute énergie ($^{125}$I, $^{32}$P), les protéines peuvent être détectées directement après électrophorèse par autoradiographie:**

11. Le gel est délicatement détaché des plaques de verre, fixé dans une solution de méthanol 30% (v/v) et 10% (v/v) acide acétique, puis séché sous-vide à l'aide d'un sécheur de gel, durant 90 min à 60°C (Bio-Rad, modèle 443 ou 483).

12. Les gels séchés sont ensuite exposés avec un film X–Omat AR–5 (Kodak, Rochester N.Y., USA) dans une cassette Wolf (Picker Corporation, Cleaveland, Ohio, USA) avec un écran intensifiant Lightning Plus (Dupont, Wilmington, De, USA). Le temps d'exposition à –70°C est déterminé par l'activité du marqueur radioactif utilisé et sa quantité incorporée dans l'échantillon. Il peut varier de quelques heures à plusieurs jours. Les gels peuvent aussi être exposés sans séchage, mais la résolution peut en souffrir.

**Dans le cas des émetteurs radioactifs de faible énergie ($^{3}$H, $^{14}$C, $^{35}$S), la détection est faite par fluorographie:**

11. Après avoir fixé le gel, celui-ci est immergé dans une solution d'Enlightning™ (New England Nuclear, Boston, MA, USA), contenant du 2.5–diphényloxazole pour transformer l'émission de rayons bêta pouvant marquer un film approprié. Il s'agit en fait d'une autoradiographie par scintillation, appelée fluorographie.

12. Le gel est ensuite séché sous vide et exposé à –70°C avec un film Kodak X-Omat AR–5 dans une cassette Wolf. Le temps d'exposition dépend de l'activité spécifique du marqueur et son degré d'incorporation. Nous exposons de 4 jours à deux semaines selon les cas et l'intensité désirée.

    Selon Bonner et Laskey (1974), 3000 disintégrations par minute (dpm) de $^{3}$H peuvent être détectées en 24 h d'exposition et 500 désintégrations (dpm) peuvent être détectées en 1 semaine. Lorsqu'appliqué au $^{35}$S et au $^{14}$C, la méthode est dix fois plus sensible et permet la détection de 130 désintégrations (dpm) en 24 h.

**Note sur la toxicité du Enlightning: Ce produit peut causer une irritation des yeux et de la peau. Il est recommandé de l'utiliser dans un endroit bien ventilé et de porter des gants.**

13. Les films X–Omat AR–5 sont développés dans la solution Kodak Developper and Replenisher durant 4 min. Suit un bain d'acide acétique (v/v), durant 30 sec. Les films sont ensuite fixés avec la solution Kodak Rapid Fixer and Hardener durant 2 min, puis rincés à l'eau courante

avant d'être séchés à l'air libre ou dans une étuve à air circulé.

## 3. DISCUSSION

La Figure 2, montre les résultats en immunoprécipitation du virus herpes bovin type 1 avec un sérum convalescent et un anticorps monoclonal neutralisant. La piste 1 nous montre une multitude de bandes parmi lesquelles il est difficile d'identifier les protéines virales. Par immunoprécipitation (piste 2) le patron de protéines virales est précisé et les protéines cellulaires sont éliminées. Cette technique nous permet d'identifier clairement par quelle protéine est porté l'épitope défini par un anticorps monoclonal ayant une activité neutralisante: la piste 4 nous montre qu'un épitope de neutralisation est porté sur la glycoprotéine de 90 000 Da.

Plusieurs points doivent être considérés comme critiques pour obtenir des résultats optimums. Le sérum immun doit être spécifique aux protéines virales avec peu ou pas de réaction avec les cellules utilisées pour produire le virus. Pour ce faire, un sérum convalescent après une infection naturelle est toujours préférable à un sérum produit par l'inoculation d'animaux de laboratoire. Lorsque l'on ne dispose pas de sérum convalescent, une infection par voie naturelle est recommandé (instillation ou ingestion). Il faut toujours inclure un témoin négatif ou présérum. En général, les anticorps monoclonaux ont une très grande spécificité; cependant dans plusieurs cas où plus d'une protéine est immunoprécipitée, il faut inclure des témoins appropriés pour contrôler s'il s'agit de sous-unités d'une même protéine ou s'il s'agit de réactions croisées (reconnaissance du même épitope porté par des protéines différentes).

Bien que la précipitation des complexes antigènes anticorps soit efficace avec la protéine A, il est à noter que certaines immunoglobulines du groupe G réagissent mal avec cette protéine. C'est en particulier le cas de l'$IgG_3$ humaine (voir Bulletin No 5, Separation News de Pharmacia, 1979). Il peut donc parfois être utile d'avoir recours à un anti-sérum anti-IgG que l'on fixe à la protéine A-Sepharose pour immunoprécipiter. On procède de la façon suivante: dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, on met en contact 50 µL de protéine A-Sepharose avec 10 µL d'anti-sérum anti-IgG, durant 2 h à 37°C, avec agitation constante. Cette étape est suivie de 3 lavages avec le tampon RIPA et l'on poursuit la technique telle que décrit précédemment. Plusieurs auteurs utilisent une centrifugeuse de type Eppendorf (Brinkman, Westbury, N.Y., USA) pour effectuer les lavages des immunobilles et des immunoprécipitats. Ce type de centrifugeuse fonctionne à 12 800 x *g* et sédimente souvent des agrégats non spécifiques. D'autre part, l'utilisation d'une centrifugeuse générant un champ gravitationnel inférieur à 500 x *g*, est suffisant pour sédimenter les complexes immuns mais évitant d'entraîner plusieurs des contaminants laissés en suspension.

Au cours de l'électrophorèse des échantillons immunoprécipités, il est utile d'inclure des marqueurs de masse moléculaire pour identifier et caractériser les bandes observées. L'on utilise des marqueurs radioactifs disponibles de New England Nuclear (methylated $^{14}$C-labelled proteins): les masses moléculaires des protéines disponibles couvrent la gamme de 5 760 à 200 000 Da, ce qui est suffisant dans la plupart des cas. Etant donné le grand nombre de marqueurs radioactifs disponibles sur le marché, comment peut-on fixer son choix afin d'obtenir un bon rendement en fonction du coût?

Notre choix s'est porté sur le $^{14}C$ comme marqueur d'acides aminés ou de précurseurs saccharidiques des glycoprotéines, car il est un constituant de tous les acides aminés et hydrate de carbone, d'où la facilité d'obtenir un meilleur marquage. Cet isotope radioactif a une longue demi-vie (5 760 années) et peut être détecté à 150 dpm comparativement à 3000 dpm pour le $^{3}H$ (demi-vie de 12.26 années) soit un facteur 20 fois plus élevé. Pour obtenir la même détection lorsque nous utilisons 5 µCi/mL pour le marquage, nous préparons beaucoup moins d'échantillon viral; conséquemment, le coût est moindre, même si ce produit est plus coûteux. Le $^{35}S$ présente le désavantage de n'être associé qu'à seulement deux acides aminés, la méthionine et la cystine et le marquage des protéines avec ces deux précurseurs est inégal ou absent dans le cas de protéines n'ayant pas de méthionine ou de cystine. Aussi, sa demi-vie (87.2 jours) peut limiter son utilisation. Le $^{32}P$ (demi-vie de 14.3 jours) est surtout utilisé pour marquer les acides nucléiques et, en quelques rares occasions, pour marquer les phosphoprotéines. L'iode–125 (demi-vie de 60 jours) n'est utilisé qu'après marquage chimique et souvent la protéine est endommagée par ce traitement. Cet isotope a l'avantage d'être comparativement très peu cher mais sa demi-vie est relativement courte.

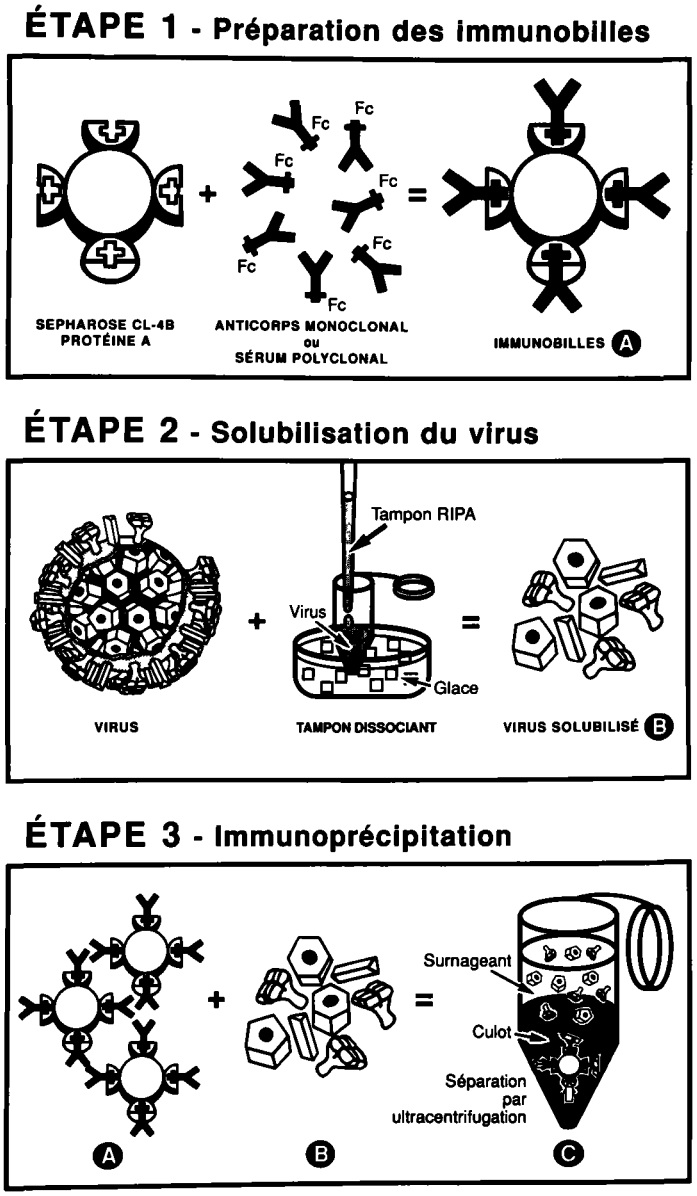


**Figure 1**

**Représentation schématique des différentes étapes d'immunoprécipitation avec un anticorps monoclonal**

(A) L'anticorps monoclonal est adsorbé aux billes de Sepharose-protéine A. (B) Le virus est dissocié en ses différentes sous-unités protéiques avec du tampon RIPA. (C) Les immunobilles préparées en A sont mises en contact avec les protéines virales solubilisées: il y a liaison spécifique de l'anticorps monoclonal avec son épitope porté par une des protéines virales; le complexe protéine virale-immunobilles est ensuite séparé par centrifugation et analysée par électrophorèse et fluorographie.

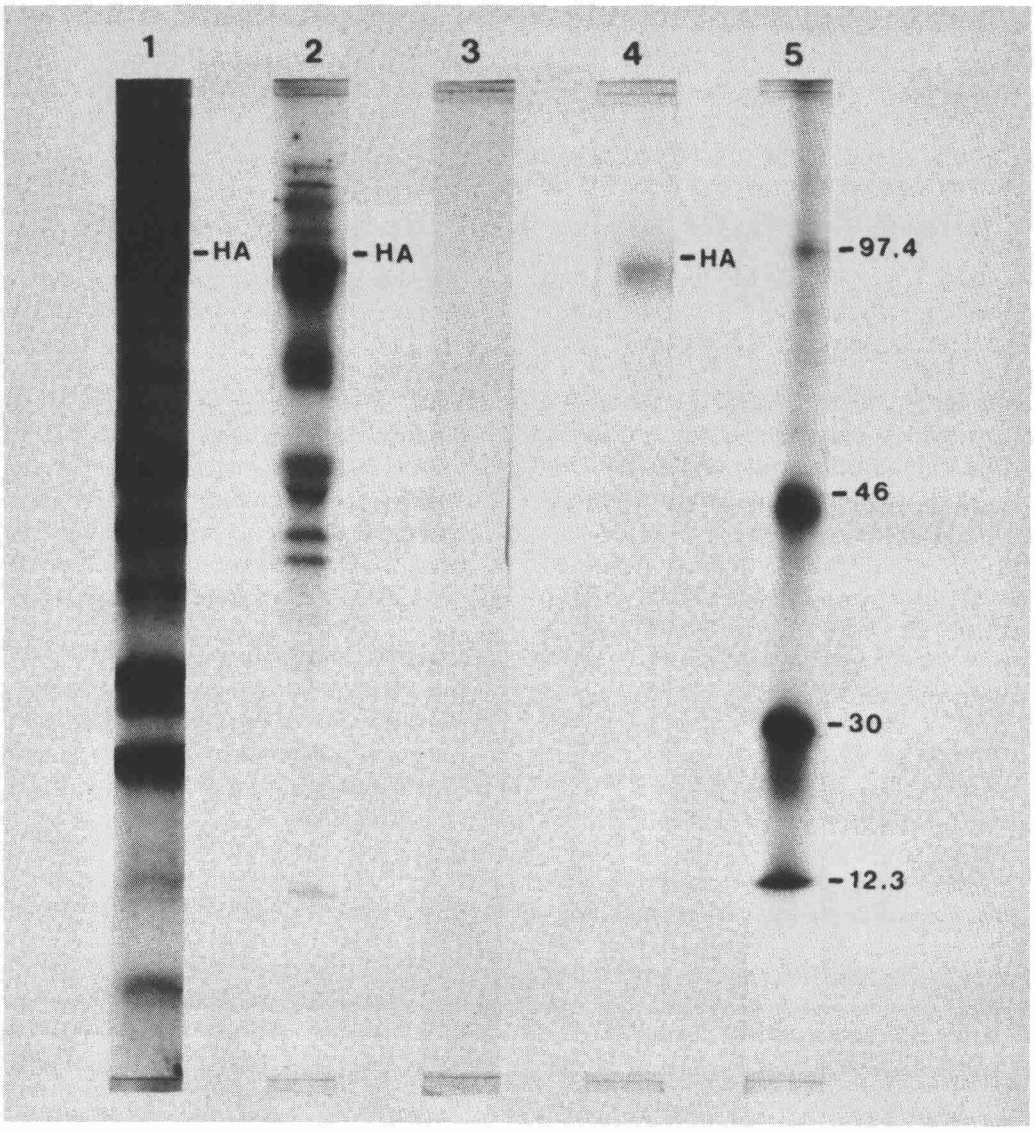


**Figure 2**

**Immunoprécipitation des protéines virales du virus herpès bovin type 1 avec un sérum convalescent et un anticorps monoclonal neutralisant.**

1. Surnageant viral solubilisé.

2. Protéines virales immunoprécipitées par un sérum convalescent, titre neutralisant 1/258.

3. Témoin négatif immunoprécipité avec un sérum négatif.

4. Anticorps monoclonal neutralisant identifiant un épitope majeur de neutralisation sur l'hémagglutinine de 90 000 Da.

5. Marqueurs de masse moléculaire marqués au $^{14}C$: phosphorylase B (97 400), ovalbumine (46 000) anhydrase carbonique (30 000 ), cytochrome (12 300).

## 4. RÉFÉRENCES

Bonner, W.M. et Laskey, R.A. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46: 83-88.

Goding.J.W. 1983. Monoclonal antibodies: Principles and practices. Academic Press, New York, 276 pages.

Kessler, S.W. 1981. Use of protein A–bearing staphylococci for the immuno-precipitation and isolation of antigens from cells. Meth. Enzymol. 73: 442-471.

Laemmli, U.K.. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227: 680-685.

Laskey, R.A. et Mills, A.D. 1975. Quantitative film detection of $^{3}H$ and $^{14}C$ in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56: 335-341.

Laskey, R.A. et Mills, A.D. 1977. Enhanced autoradiographic detection of $^{32}P$ and $^{125}I$ using intensifying screens and hypersensitized film. FEBS Letters 82: 314-316.

Norrby, E., Örvell, C., Vanvik, B. et Cherry, J.D. 1981. Antibodies against measles virus polypeptides in different disease conditions. Infect. Immun. 34: 718-724.

Ohara, Y., Tashiro, M., Takase, S. et Homma, M. 1985. Detection of antibody to M protein of measles virus in patients with subacute sclerosing panencephalitis: A comparative study on immunoprecipitation. Microbiol. Immunol. 29: 709-723.

Swanstrom, R. et Shank, P.R. 1978. X–ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes $^{32}P$ and $^{125}I$. Anal. Biochem. 86: 184-192