

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines F et G du virus respiratoire syncytial bovin (BRSV)

Bontems, Sébastien

Award date:
1996

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTES UNIVERSITAIRES
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

FACULTE DES SCIENCES

**Production et caractérisation d'anticorps
monoclonaux dirigés contre les protéines F et
G du Virus Respiratoire Syncytial Bovin
(BRSV).**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade
de Licencié en Sciences
biologiques
Bontems Sébastien
1996**

Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines F et G du Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV)

BONTEMS Sébastien

Résumé

Le Virus Respiratoire Syncytial Bovin (BRSV) est une des causes principales d'infections sévères des voies respiratoires inférieures chez les jeunes veaux.

De par leur localisation en surface de ce virus, les protéines F et G se trouvent être les cibles principales de la réponse immunitaire développée par l'hôte à l'encontre de ce pathogène.

Dès lors, des anticorps dirigés contre ces deux protéines peuvent être utilisés pour étudier la réponse protectrice engendrée contre ce virus ou servir d'outils lors d'études à caractère épidémiologique.

Dans cette optique, le travail effectué au cours de ce mémoire s'est focalisé sur la production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines F et G du BRSV.

Un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine F et un autre contre la protéine G ont été obtenus suite à deux fusions indépendantes.

Une caractérisation fonctionnelle et antigénique a été réalisée pour ces deux anticorps ainsi que pour un troisième dirigé contre la protéine F et produit précédemment au sein de notre laboratoire.

Au vu de leur profil de réactivité sur différentes souches virales, il apparaît que nos anticorps monoclonaux constituent des outils de choix lors d'études épidémiologiques. A ce titre, l'analyse antigénique révèle que l'épitope reconnu par notre anticorps anti-protéine G n'est conservé que chez certaines souches de BRSV.

D'autre part, il apparaîtrait que les épitopes reconnus par les anticorps anti-protéine F puissent être localisés au niveau d'un site majoritairement assigné à des anticorps protecteurs.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1996

Promoteur: Prof. J.-J. Letesson

Ce mémoire fut pour moi une expérience extraordinaire et enrichissante à tout point de vue.

Pour cela, j'aimerais remercier le professeur J.J. Letesson de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi que pour ses encouragements dans les moments plus critiques.

Mes remerciements les plus chaleureux vont à Jean-Philippe Matheise. Merci à toi J.P. pour ta permanente disponibilité, ton éternelle bonne-humeur, ton aide précieuse et surtout pour m'avoir fait partager ta passion pour le BRSV (surtout celle de la protéine F).

Un tout grand merci à Christian Didembourg, technicien hors pair, pour avoir pris la patience de m'enseigner toutes ses techniques nécessaires au bon développement d'un 'petit mémorant' comme moi (surtout les Western-blot HéHé!!).

J'aimerais remercier Martine Albert, maman comblée, pour sa gentillesse légendaire et ses conseils avisés en matière de culture cellulaire.

Un tout tout grand merci à vous, membres du laboratoire, pour votre générosité, votre bonne humeur et votre esprit d'équipe.

J'aimerais également remercier le Dr Langedijk pour avoir gentiment accepté de réaliser quelques tests lors de ce travail.

Merçi à vous, parents, frères et soeur pour votre aide et votre soutien moral de chaque instant.

Merçi à toi, Isabelle. Merçi pour tout et pour le reste.

INTRODUCTION.....	4
I. HISTORIQUE.....	4
II. TAXONOMIE.....	4
III. PATHOLOGIE LIEE AU RSV.....	5
1. Le HRSV.....	5
2. Le BRSV.....	5
IV. STRUCTURE DU VIRUS.....	6
1. Génome du virus.....	7
2. Constituants protéiques.....	7
2.1. Les protéines non-structurales.....	7
2.2. Les protéines de nucléocapside.....	7
2.3. Les protéines de matrice.....	8
2.4. Les protéines d'enveloppes.....	8
V. LA PROTEINE G.....	10
1. Rôle de la protéine G.....	10
2. Structure de la protéine G.....	10
2.1. Analyse de la séquence de la protéine G.....	10
2.2. Glycosylations de la protéine G.....	11
2.2.1. Types de sucres impliqués.....	11
2.2.2. Proportions des sucres.....	12
2.2.3. Le rôle des sucres.....	12
2.3. Exportation et maturation de la protéine G.....	12
3. La forme soluble de G.....	13
VI. LA PROTEINE F.....	14
1. Rôle de la protéine F.....	14
2. Structure de la protéine F.....	14
2.1. Analyse de la séquence de la protéine F.....	14
2.2. Glycosylation de la protéine F.....	15
2.3. Oligomérisation de la protéine F.....	15
2.4. Clivage de la protéine F.....	16
2.5. Expression de la protéine F en surface.....	17
VIII. VARIABILITE DES SOUCHES VIRALES.....	18
1. Variabilité des souches humaines.....	18
1.1. Variabilité antigénique.....	18
1.2. Variabilité structurale.....	19
1.3. Variabilité génétique.....	19
2. Variabilité des souches bovines.....	20
2.1. Variabilité antigénique.....	20
2.2. Variabilité structurale.....	21
2.3. Variabilité génétique.....	21
IX. RÔLE DES ANTICORPS ANTI-F ET ANTI-G DANS LA PROTECTION.....	22
1. La réponse protectrice.....	22
2. Transfert passif des anticorps.....	23
3. Les anticorps neutralisants.....	23
X. Analyse antigénique des protéine F et G.....	24
1. Introduction.....	24
1.2. Identification des régions antigéniques.....	25
1.3 Localisation des épitopes.....	25
2. Analyse antigénique de la protéine F.....	25
2.1 Identification des régions antigéniques.....	26

3. Analyse antigénique de la protéine G.....	28
3.1. Classification des épitopes en fonction de leur variabilité.....	29
3.1.1. Epitopes conservés.....	29
3.1.2. Epitopes spécifiques des groupes viraux.....	29
3.1.3. Epitopes spécifiques des souches.....	30
3.2. Classification des épitopes en fonction de leur structure.....	31
BUT DU TRAVAIL.....	32
RESULTATS.....	33
CHAPITRE I. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX.....	33
1. Préambule.....	33
2. Préparation de la protéine G.....	33
3. Immunisation des souris.....	34
3.1. Evaluation de la spécificité des sera.....	35
3.2. Résultats.....	35
4. Première Fusion.....	35
4.1. Première sélection des hybridomes.....	36
4.2. Résultats.....	37
4.3. Seconde sélection des hybridomes.....	39
4.4. Test des surnageants en ELISA indirect.....	40
4.5. Clonage des hybridomes.....	41
5. Seconde fusion.....	42
5.1. Première sélection des hybridomes.....	43
5.2. Seconde sélection des hybridomes.....	44
5.3. Clonage du 1D1 et du 3A11.....	45
6. Origine du 2D6.....	46
CHAPITRE II. PREPARATION DES ANTICORPS POUR LEUR CARCTERISATION.....	47
1. Production in vivo d'anticorps monoclonaux.....	47
2. Test d'isotypie de nos anticorps.....	47
2.1. Principe du test.....	47
2.2. Résultats.....	48
3. Purification des liquides d'ascites.....	48
CHAPITRE III. CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX.....	48
1. Caractérisation fonctionnelle des anticorps monoclonaux.....	48
1.1. Principe du test de séroneutralisation.....	49
1.2. Résultats.....	49
2. Caractérisation antigénique des anticorps monoclonaux.....	49
2.1. Tests des anticorps monoclonaux sur différentes souches virales.....	50
2.2. Western blotting.....	51
2.3. Titrage de nos anticorps monoclonaux.....	52
2.4. Tests de compétition.....	54
DISCUSSION.....	61
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	66
CHAPITRE I. Préparation des antigènes pour les immunisations.....	69
1. Préparation de la protéine G purifiée.....	69
1.1 Souche virale et lignée cellulaire.....	69
1.2. Multiplication du virus <i>in vitro</i>	69
Culture de cellules Vero.....	69
Culture du RSV sur les cellules Vero.....	70
Détermination du titre viral.....	71
1.3. Purification des protéines G et F.....	72

2. Préparation du baculovirus exprimant la protéine G.....	74
CHAPITRE II. Immunisations des souris.....	75
1. Immunisation.....	75
2. Dernières stimulations.....	75
CHAPITRE III. Production des hybridomes.....	76
1. Principe.....	76
2. Choix du myélome.....	77
3. Milieux de culture.....	77
4. Protocole de fusion.....	78
4.1. Préparation des cellules nourricières.....	78
4.2. Préparation des splénocytes.....	78
4.3. Préparation du myélome.....	79
4.4. Fusion proprement dite.....	79
4.5. Clonage des hybridomes par la méthode des dilutions-limites.....	80
4.6. Congélation et décongélation des hybridomes.....	81
4.7. Production d'anticorps monoclonaux <i>in vivo</i>	82
4.8. Détermination des isotypes.....	82
4.9. Purification des liquides d'ascites par chromatographie d'affinité.....	84
CHAPITRE IV. Tests de caractérisation des anticorps.....	85
1. Test en ELISA indirect.....	85
2. Test sur monocouches de cellules infectées.....	87
3. Tests en dot-blot.....	88
4. Tests de Western-Blotting.....	89
5. Tests de séroneutralisation.....	91
6. Tests de compétition.....	91
6.1. Couplage des Ac. Mon. à la peroxydase.....	91
6.2. Optimisation des conditions d'utilisation des anticorps couplés.....	92
6.3. Tests de compétition proprement dits.....	93
BIBLIOGRAPHIE.....	95

INTRODUCTION

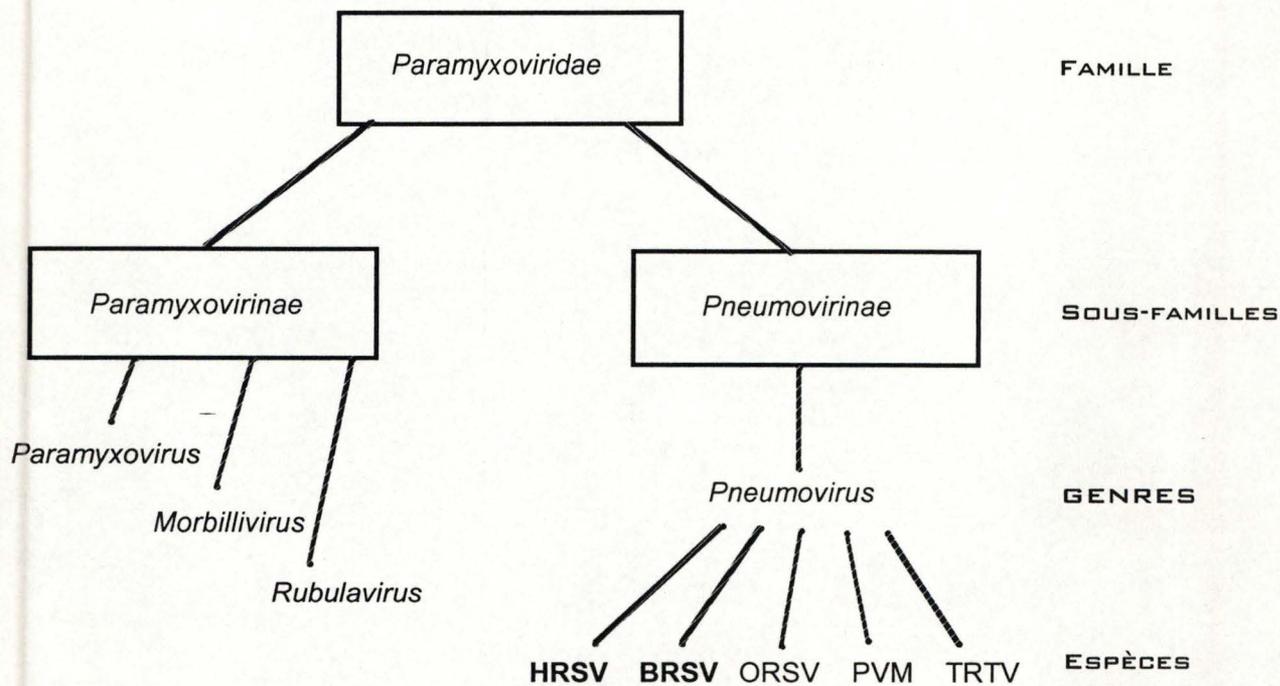


Figure 1: Taxonomie des *Paramyxoviridae* (d'après Murphy *et al.*, 1995)

Abréviations: HRSV (Human Respiratory Syncytial Virus), BRSV (Bovine Respiratory Syncytial Virus), ORSV (Ovine Respiratory Syncytial Virus), PMV (Pneumonia Virus of Mice), TRTV (Turkey Rhinotracheitis Virus)

INTRODUCTION

Le Virus Respiratoire Syncytial (RSV) est une des causes principales d'infections des voies respiratoires chez les individus en bas âge. Il est en effet responsable du développement de pneumonies et de bronchites dont l'issue peut, dans certains cas, se révéler fatale. Ce virus se caractérise également par le fait qu'il arrive à se développer malgré la présence d'anticorps circulants d'origine maternelle et que la réinfection est un phénomène assez courant.

I. HISTORIQUE

C'est en 1956, sur des singes atteints de coryza, que fut isolé pour la première fois le virus. Pour cette raison, il fut initialement appelé 'Chimpanzee Coryza Agent' mais, peu de temps après, on découvrit le même virus chez des enfants souffrant de maladies du système respiratoire. C'est à cette époque qu'il reçut son nom définitif de Virus Respiratoire Syncytial, et ce en fonction des caractéristiques cytopathogènes qu'il occasionne sur des tissus mis en culture (McIntosh & Chanock, 1990).

Lorsque Paccaud et Jacquier isolèrent le virus sur du bétail en 1968 (Kimman & Westenbrink, 1990), on fit alors la distinction entre les souches humaines (Human Respiratory Syncytial Virus, HRSV) et bovines (Bovine Respiratory Syncytial Virus, BRSV).

L'analyse antigénique et moléculaire de souches isolées chez l'agneau a permis d'identifier un troisième hôte spécifique du RSV. Une espèce distincte de deux autres fut ainsi isolée: le ORSV (Ovine Respiratory Syncytial Virus).

II. TAXONOMIE

Le RSV a été classé dans le genre *Pneumovirus* (seul genre de la sous-famille des *Pneumovirinae*), de la famille des *Paramyxoviridae* (figure 1). Cette classification fut établie en fonction des propriétés morphologiques et structurales du virus. Il s'agit d'un virus enveloppé et formé d'une nucléocapside hélicoïdale symétrique de 12 à 15 nanomètres. Celle-ci renferme le

génomique du RSV qui consiste en un brin unique d'ARN négatif dont la réplication s'effectue dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Le genre *Pneumovirus* se distingue des autres genres de la famille des *Paramyxoviridae* principalement par le fait qu'il ne possède pas d'activité neuraminidasique et hémagglutinante, ainsi que par des différences au niveau du nombre de protéines d'enveloppe (Stott & Taylor, 1984) (McIntosh & Chanock, 1990) (Murphy *et al.*, 1995).

III. PATHOLOGIE LIEE AU RSV

1. Le HRSV

Le Virus Respiratoire Syncytial est la plus grande cause de maladies du système respiratoire inférieur observées chez les enfants et les jeunes nourrissons. Le coût annuel d'hospitalisation pour des bronchiolites a été calculé aux Etats-Unis en 1988 et s'élève à quelques 300 millions de dollars. En effet, plus de 91000 enfants y sont hospitalisés chaque année et 4500 meurent des suites de l'infection par ce virus (Cody, 1994) (Openshaw, 1995). La situation est telle que la lutte contre ce pathogène est devenue une des priorités de l'O.M.S. (Organisation Mondiale de la Santé).

2. Le BRSV

Peu d'études à grandes échelles se sont intéressées à l'impact économique du BRSV. Il apparaît toutefois que l'essentiel des pertes soit plus attribué aux séquelles qu'à la mortalité due à ces infections. A titre d'exemple, une étude réalisée dans les années '80 en Hollande a permis d'évaluer le coût total occasionné par ce virus sur le bétail. Celui-ci, calculé en fonction des pertes directes, des frais de vétérinaire et du retard de croissance (essentiel du manque à gagner), s'élève à quelques 25 Ecus par tête de bétail et par an. (Verhoeff *et al.*, 1989).

Lors d'une infection par le BRSV, la maladie va se développer en 2 épisodes distincts chez des individus âgés entre 3 et 9 mois (parfois même jusqu'à l'âge de 15 mois) (Wellemans, 1990).

Dans un premier temps, l'animal est atteint de toux sèche, de conjonctivite larmoyante et souffre de décharge nasale importante. A ce moment là, l'animal est en légère hyperthermie, avec une température avoisinant les 40°C.

Quelques jours plus tard, quand tout semble être revenu à la normale, la seconde phase se développe chez certains individus. La respiration de l'animal est rapide, difficile et aggravée par la toux. Cette phase de la maladie est caractérisée par l'apparition d'un emphysème pulmonaire (Everard & Milner, 1992).

L'animal est anorexique et souvent constipé. Il ne sait plus se coucher et fait des efforts désespérés pour pouvoir respirer par la bouche (Wellemans, 1990).

La mort, qui survient généralement quelques heures après l'apparition des premiers symptômes, peut frapper jusqu'à 30 % des individus infectés par le virus. Chez les animaux survivants, une amélioration peut-être notée en 2 à 5 jours après le début du second stade de la maladie (Brugère-Picoux & Hérout, 1985).

Des symptômes légèrement différents ont été observés chez du bétail âgé de 6 semaines: on trouve peu ou pas de lésions suite à un emphysème pulmonaire, mais une surinfection bactérienne n'est pas rare. Toux, fortes fièvres et décharges nasales sont également des symptômes courants. (Wellemans, 1990) (Brugère-Picoux & Hérout, 1985).

De nombreuses études ont permis de montrer que toutes ces lésions et les symptômes cliniques associés n'étaient pas dûs exclusivement à un effet direct du virus, mais qu'il y aurait une contribution immunopathologique sous-jacente. A l'heure actuelle, on ne connaît pas encore très bien la manière dont les différents acteurs de la réponse immunitaire pourraient intervenir pour potentialiser la maladie.

IV. STRUCTURE DU VIRUS

Le Virus Respiratoire Syncytial (qu'il soit humain ou bovin) est un virus très pléomorphe dont le diamètre varie entre 80 et 450 nanomètres (Wellemans, 1990) et est composé d'une nucléocapside hélicoïdale, support de la réplication, enveloppée. Lors de leur maturation terminale, les particules virales acquièrent leur enveloppe en bourgeonnant à partir de la cellule

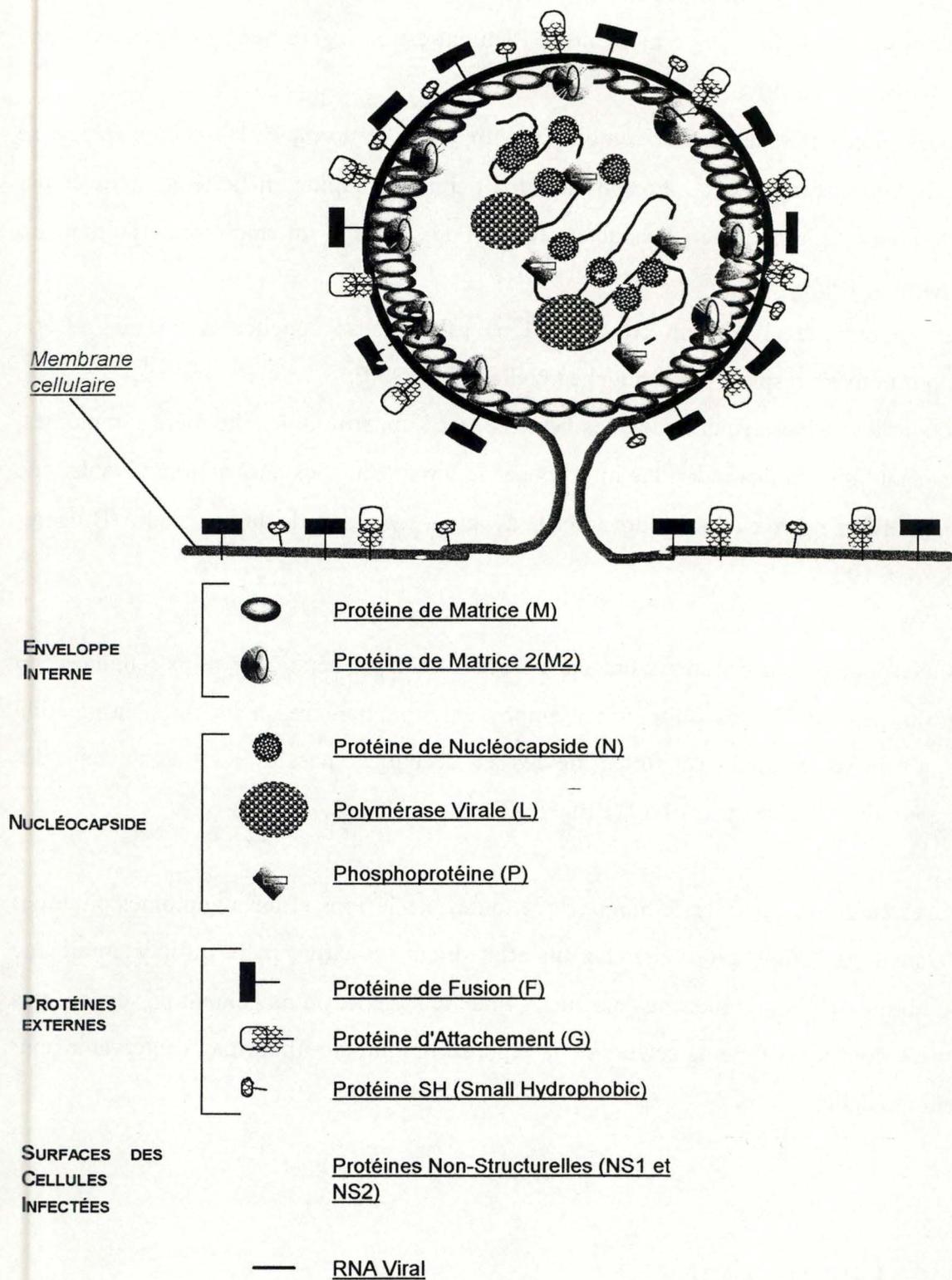


Figure 2: Représentation schématique d'un bourgeonnement d'une particule de RSV.

La localisation des différentes protéines induites au cours d'un cycle infectieux est indiquée.

hôte. Cette enveloppe inclut plusieurs glycoprotéines, principales responsables du pouvoir infectieux du virus (figure 2) (McIntosh & Chanock, 1990).

1. Génome du virus

Le génome du virus, renfermé dans sa nucléocapside, consiste en un simple brin d'ARN négatif d'une Masse Moléculaire (MM) estimé à 5.000 kDa (Huang *et al.*, 1982). On retrouve une région 'leader' et 'trailer' aux extrémités 3' et 5' respectivement du brin d'ARN. Ces séquences nucléotidiques contiennent le site d'initiation de l'encapsidation ainsi que le promoteur qui servira à la transcription du génome (Collins *et al.*, 1991). Celle-ci se réalise grâce à une polymérase transportée par le virus et génère dix ARNm coiffés et polyadénilés. Chacun de ces messagers code pour une protéine unique. L'ordre de transcription de ces protéines est le suivant : 3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L-5' (Dickens *et al.*, 1984) (Collins *et al.*, 1984). Les dix gènes viraux n'ont en commun que les séquences "gene start" et "gene end" jouxtant chacun des gènes et dirigeant la polymérase virale lors de la transcription de l'ARN génomique. A noter également la présence de régions intergéniques non conservées et de longueurs variables (figure 3) (McIntosh & Chanock, 1990).

2. Constituants protéiques

2.1. Les protéines non-structurales

Deux des protéines virales produites lors d'un cycle infectieux nommées NS1 et NS2, sont des protéines non structurales de fonction encore mal définie. On les retrouve dans les cellules infectées mais pas dans les virions. Elles ont une MM respective de 15.6 et de 14.7 kDa.

2.2. Les protéines de nucléocapside

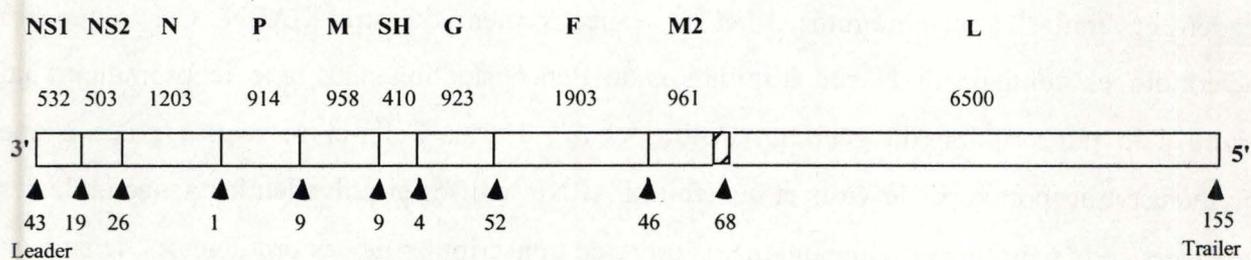


Figure 3: Carte génétique de l'ARN génomique du RSV. Les différentes régions codantes ainsi que leur longueur sont spécifiées. Les flèches verticales mentionnent les séquences intergéniques (dont la taille exprimée en nucléotides est indiquée dans la partie inférieure) (d'après McIntosh et Chanock, 1990).

Trois protéines forment, ensemble avec l'ARN génomique, la nucléocapside. Il s'agit des protéines N (Nucleoprotein), P (Phosphoprotein) et L (Large protein).

La protéine N est la plus abondante au sein de la nucléocapside. Elle a une MM de 43.5 kDa et est étroitement associée avec l'ARN génomique. Outre son rôle de support principal de l'ARN, la protéine N constitue avec les protéines L et P la clé de voûte des processus de réplication et de transcription du génome viral.

La protéine L, quant à elle, est relativement hydrophobe et a une MM de 250 kDa. Il s'agit de la polymérase ARN-dépendante virale, capable de coiffer et de méthyler les ARNm (Barik, 1993). C'est la seule protéine qui, à ce jour, n'a pas encore été séquencée chez le BRSV

La protéine P tient son nom du fait qu'elle soit énormément phosphorylée. Elle est relativement acide et a une MM, avant phosphorylation, de 27.1 kDa. Elle intervient également dans le processus de régulation de la transcription virale (Grosfeld *et al.*, 1995) (Yu *et al.*, 1995).

2.3. Les protéines de matrice

La protéine M (Matrix) est la protéine de matrice. On la retrouve au niveau de la membrane interne du virus. Cette protéine d'une MM de 28.7 kDa est relativement basique et possède 2 régions hydrophobes au niveau de la région carboxy-terminale qui pourraient peut-être interagir avec la membrane des cellules infectées.

Il existe également une deuxième protéine de matrice (M2 ou 22K) mais dont le rôle et la localisation ne seraient pas encore bien définis. Elle pourrait toutefois avoir un rôle dans l'élongation de la transcription (Collins *et al.*, 1995) Cette protéine M2, d'une MM de 22.2 kDa, est très basique et hydrophile.

Par analogie avec les autres *Paramyxoviridae*, on suspecte que ces deux protéines aient un rôle dans l'assemblage du virus.

2.4. Les protéines d'enveloppes

La protéine SH (pour Small Hydrophobic) a été identifiée à la surface des virions. On ne connaît pas non plus le rôle précis de cette glycoprotéine membranaire, mais les travaux d'Heminway *et al.* (1994) ont montré qu'elle intervient dans le processus de pénétration du virion dans la cellule.

Protéines	Taille (en acides aminés)	Masses Moléculaires (en Kda)		Localisation	Fonctions
		déduit de la séquence en aa	après maturation		
NS1	139	15,6	-	cellules infectées	inconnue
NS2	124	14,7	-	cellules infectées	inconnue
N	391	43,5	-	nucléocapside	structure, transcription et réplication de l'ARN
P	241	27,1	-	nucléocapside	transcription et réplication de l'ARN?
M	256	28,7	-	partie interne de l'enveloppe	assemblage du virion?
SH	64	7,5	13-15 à 21- 30	surface des cellules infectées et virion	fusion des membranes
G	298	32,6	84-90	partie externe de l'enveloppe	attachement du virus à la cellule
F	574	63,5	68-70	partie externe de l'enveloppe	fusion des membranes
M2 (22k)	194	22,2	-	partie interne de l'enveloppe	transcription de l'ARN, assemblage du virion?
L	2165	250	-	nucléocapside	polymérase de la transcription et de la réplication de l'ARN

Tableau I: Principales caractéristiques des protéines produites lors d'un cycle de réplication du HRSV
(d'après McIntosh et Chanock, 1990).

A noter qu'elle s'accumule intracellulairement sous différentes formes et ce, en fonction de son degré de glycosylation (Olmsted & Collins., 1989).

La protéine G est la protéine d'attachement du virus sur la membrane de la cellule infectée. Par contraste avec les autres *Paramyxovirus*, on n'y a pas relevé d'activité hémagglutinante ou neuraminidasique. Cette protéine membranaire se caractérise par le fait qu'elle est fortement glycosylée. Plus de 60 % de sa MM située vers entre 84 et 90 kDa, est attribué à des chaînes d'hydrocarbonées. La protéine G est également la protéine qui présente le plus de variabilité entre les différentes souches virales (tant chez le HRSV que chez le BRSV).

La protéine F (Fusion protein) est responsable de la fusion de l'enveloppe virale à la membrane de la cellule-hôte permettant ainsi l'entrée du virus dans celle-ci. Elle a une MM variant entre 68 et 70 kDa (Stott & Taylor, 1984) (McIntosh & Chanock, 1990)..

Le tableau I reprend la localisation, la structure et la fonction de ces protéines virales.

Les protéines F et G, de par leur localisation en surface du virus, se trouvent être les cibles principales de la réponse immunitaire humorale (anticorps) développée par l'individu infecté. Vu leur rôle stratégique dans la lutte contre le RSV, il est intéressant de s'y attarder quelque peu.

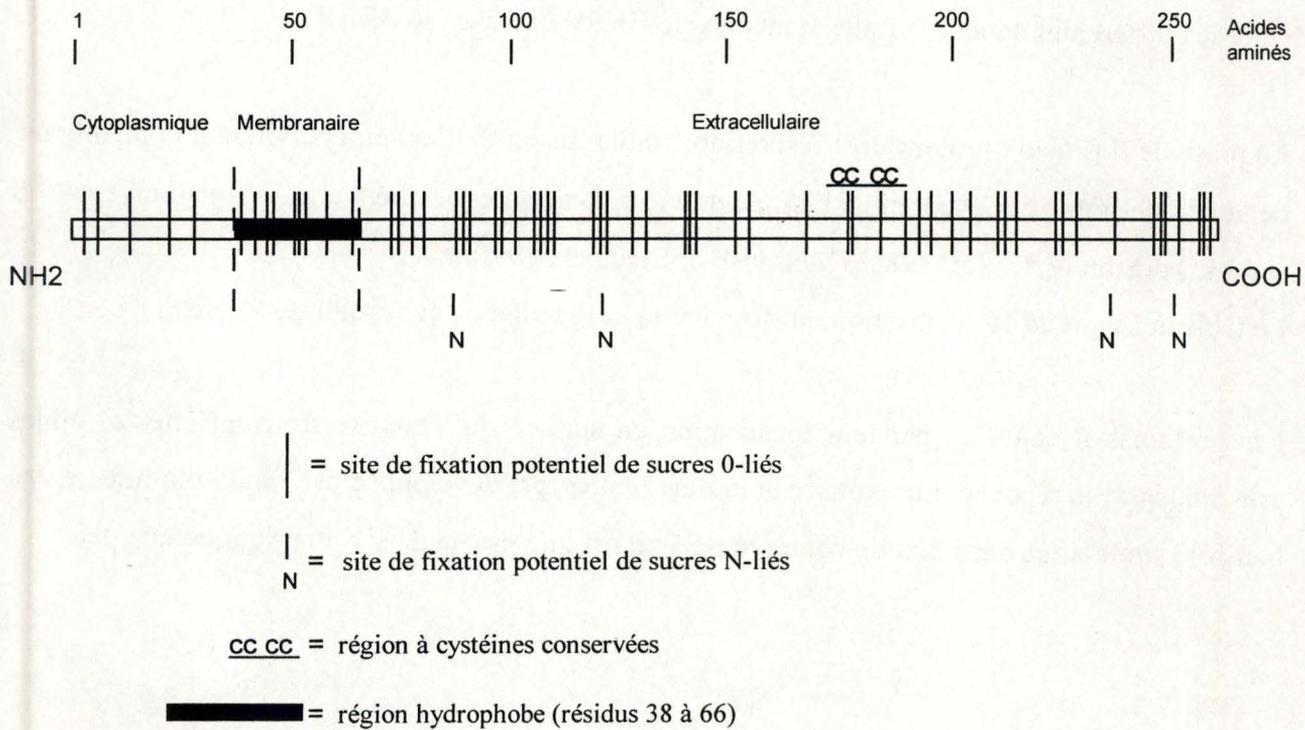


Figure 4: Représentation schématique de la protéine G du BRSV (d'après Lerch *et al.*, 1990)

V. LA PROTEINE G

La plupart des études réalisées sur la protéine G concernent les souches humaines. Proportionnellement, peu d'études ont été consacrées à la protéine G du BRSV, mais sa structure générale et son rôle étant similaires à ceux du HRSV, une bonne partie des résultats obtenus chez l'un peuvent être transposés à l'autre.

1. Rôle de la protéine G

La fonction principale de la protéine G est de permettre l'attachement du virus à la cellule hôte (Wertz *et al.*, 1984) (Levine *et al.*, 1987).

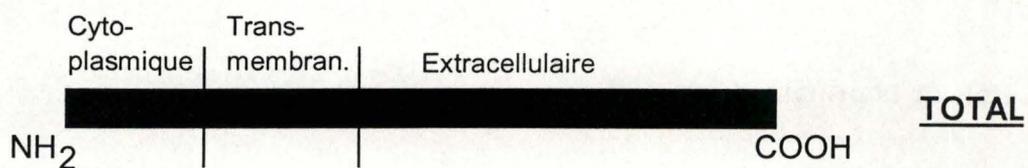
Si son rôle semble bien défini, le récepteur de cette protéine sur la cellule est par contre encore mal connu. Vu le large spectre de cellules pouvant être infectées par le RSV (cellules épithéliales, mononucléées sanguines, macrophages, fibroblastes...), ce récepteur paraît plutôt de type ubiquiste (Panuska *et al.*, 1992). La fixation semble y être médiée, comme chez les autres *Paramyxoviridae*, par la présence d'acide sialique que l'on retrouve en abondance au niveau de la surface des cellules hôtes (Walsh *et al.*, 1984) (Stott & Taylor, 1984).

2. Structure de la protéine G

2.1. Analyse de la séquence de la protéine G

La séquence nucléotidique de la protéine G du HRSV fut publiée pour la première fois par l'équipe de Wertz (Wertz *et al.*, 1985). Cette séquence, longue de 918 nucléotides, code pour une protéine de 298 acides aminés. La protéine G du BRSV, légèrement plus courte que son homologue humaine, fait 257 acides aminés.

La protéine G présente les caractéristiques d'une protéine membranaire de type II (extrémités N-terminale cytoplasmique et C-terminale extracellulaire), dans laquelle on distingue une région cytoplasmique, une région transmembranaire et un ectodomaine (figure 4) (Wertz *et al.*, 1985).



	Cyto- plasmique	Trans- membran.	Extracellulaire	<u>TOTAL</u>
<u>Bovine contre humaine A2</u>	43%	59%	21%	29%
<u>Bovine contre humaine 18537</u>	43%	59%	22%	30%
<u>Humaine A2 contre Humaine 18537</u>	81%	86%	44%	53%

Figure 5: Comparaison du pourcentage d'identité en acides aminés entre les différents domaines de la protéine G du HRSV et du BRSV (d'après Lerch *et al.*, 1990)

La protéine G des souches humaines et bovines ont également en commun la localisation des "plots" hydrophobes, le pourcentage de résidus Ser, Thr et Pro ainsi que la présence de quatre résidus Cys conservés aux positions 173, 176, 182 et 186.

Lorsqu'on fait des comparaisons de séquences entre les souches humaines et bovines, on se rend compte qu'en plus d'être de longueurs différentes, elles ont un pourcentage de divergence assez élevé (29 et 30% d'identité en acides aminés) (Lerch *et al.*, 1990). Cette variabilité est la plus prononcée au niveau du domaine extracellulaire (figure 5).

L'analyse de la séquence déduite de la protéine G prédit des tailles respectives aux alentours de 32 kDa pour le HRSV et de 28.6 kDa pour le BRSV (Wertz *et al.*, 1985) (Lerch *et al.*, 1990).

Pourtant, le profil de migration de la protéine sur gel d'électrophorèse, montre que sa MM se situe entre 84 et 90 kDa (Wertz *et al.*, 1985) (Levine *et al.*, 1987). Cette différence de taille a été attribuée à une hyperglycosylation grâce à des expériences portant sur l'expression de la protéine en bactéries (Martin-Gallardo *et al.*, 1993) ou dans des lignées cellulaires déficientes en glycosylation (Wertz *et al.*, 1989).

Ces résultats mettent ainsi à jour une des principales caractéristiques de la protéine G: son hyperglycosylation

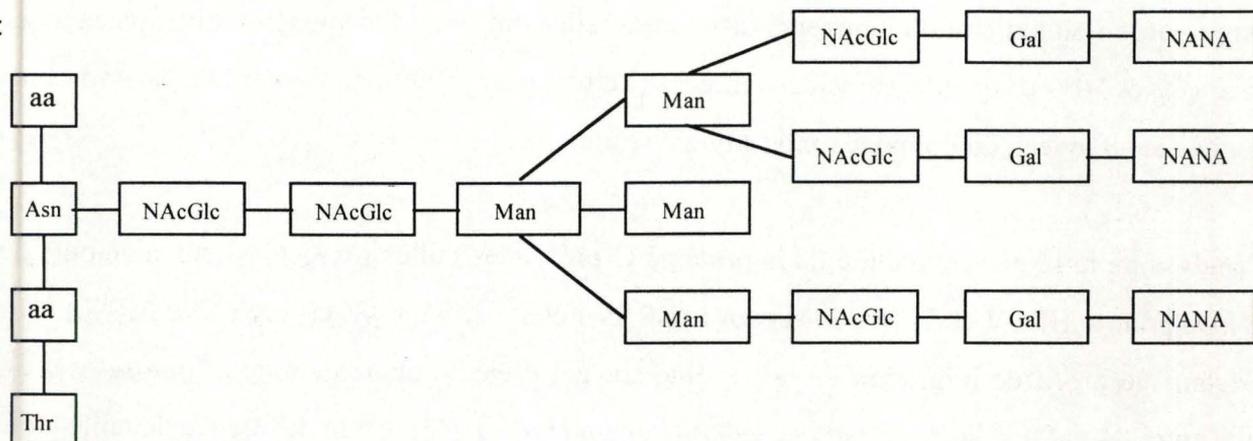
2.2. Glycosylations de la protéine G

2.2.1. Types de sucres impliqués

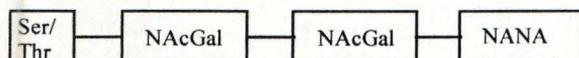
Les types de sucres présents sur la protéine G ont été analysés en suivant la maturation de la protéine en présence d'inhibiteurs de glycosylation (Lambert *et al.*, 1988) ou dans des cellules déficientes en glycosylation (Wertz *et al.*, 1989). Les résultats de ces expériences indiquent que la protéine G est composée principalement de sucres O-liés et d'un plus faible pourcentage de sucres N-liés.

Les sucres O-liés sont structurellement moins compliqués que les sucres N-liés et sont attachés aux groupements -OH de résidus Ser ou Thr de la protéine. Les sucres N-liés sont quant à eux fixés sur les groupements -NH des résidus Asn de tripeptides Asn-X-Ser/Thr, où X n'est habituellement ni une Pro ni une Asp (Olmsted *et al.*, 1989) (Wertz *et al.*, 1989) (figure 6).

a:



b:



Abréviations: aa = acides aminés
NacGlc = N-acétylgalactosamine
Man = Mannose
NacGlc = N-acétylglucosamine
Gal = Galactose
NANA = acide sialique

Figure 6: Représentation schématique de la fixation des oligosaccharides (a: sucres liés, b: sucres non liés) sur les résidus protéiques

2.2.2. Proportions des sucres

Les expériences énoncées ci-dessus indiquent aussi que la contribution des sucres O-liés dans la structure de la protéine G (60 %) est plus importante que celle des sucres N-liés (30 %). Ces résultats sont en accord avec la séquence de la protéine G. Celle-ci est en effet composée d'un nombre important (30%) de résidus Ser ou Thr (sites potentiels de fixation des sucres O-liés) alors que seulement 4 sites potentiels de N-glycosylations sont recensés (figure 4) (Olmsted *et al.*, 1989) (Lerch *et al.*, 1990).

De récentes études ont permis de montrer que cette contribution était néanmoins surestimée. Il apparaît en effet que la masse moléculaire totale des sucres impliqués dans la glycosylation de G se situe entre 12 000 et 24 000. Cette différence peut être attribuée aux effets disproportionnés des chaînes sucrées sur la mobilité électrophorétique (Olmsted *et al.*, 1989).

2.2.3. Le rôle des sucres

Lambert *et al.* (1988) ont montré que le fait d'enlever des sucres N-liés ou O-liés à la protéine G, réduisait considérablement le pouvoir infectieux du virus suggérant ainsi le rôle important joué par les sucres dans les propriétés biologiques du BRSV.

2.3. Exportation et maturation de la protéine G

La biosynthèse de la protéine G nécessitant la translocation du précurseur à travers la membrane et dans la lumière du Réticulum Endoplasmique, elle requiert la présence d'une séquence signal. De même, pour que la protéine puisse être transportée en surface de la membrane, il lui faut un site d'ancrage membranaire. Ce double rôle est joué par une région non-clivable de la protéine: le domaine Signal/Anchor (S/A) (Lichtenstein *et al.*, 1996).

Par homologie avec d'autres protéines membranaires de type II; un domaine pouvant faire office de domaine S/A a été identifié au niveau des 63 premiers acides aminés de la protéine (Collins *et al.*, 1990). L'analyse de l'hydrophobicité locale de cette portion de la protéine G a permis de localiser ensuite ce domaine S/A au niveau de la région hydrophobe majeure située entre les résidus 38 à 63 (Lichtenstein *et al.*, 1996).

3. La forme soluble de G

Outre la forme membranaire, la protéine G est également présente sous une forme sécrétée dans le milieu. La différence de taille entre la protéine G entière et Gs est approximativement de 4 kDa

Roberts *et al.* (1994) ont montré que cette protéine soluble (Gs) est issue de la traduction du même messenger que la protéine G mature, mais à partir d'un codon d'initiation différent. (Lichtenstein *et al.*, 1996) (Roberts *et al.*, 1994). Ce phénomène générerait une protéine amputée d'une partie de la région servant à l'ancrage en membrane. Cette protéine Gs subit toutefois une maturation et un transport comparable à la protéine G entière, mais le fait qu'il manque une partie de la région hydrophobe majeure, découvrant ainsi un motif de trois acides aminés servant de séquence signal pour une peptidase. Celle-ci coupe la protéine à cet endroit et libère ainsi la forme soluble dans le milieu (Lichtenstein *et al.*, 1996) (Roberts *et al.*, 1994).

Ces formes solubles de la protéine G, libérées durant l'infection par le virus, peuvent aider ce dernier dans sa lutte contre la réponse immune développée par l'individu. en fixant par exemple les anticorps dirigés contre le virus et servent à empêcher que le virus produit ne réinfecte la même cellule (Roberts *et al.*, 1994).

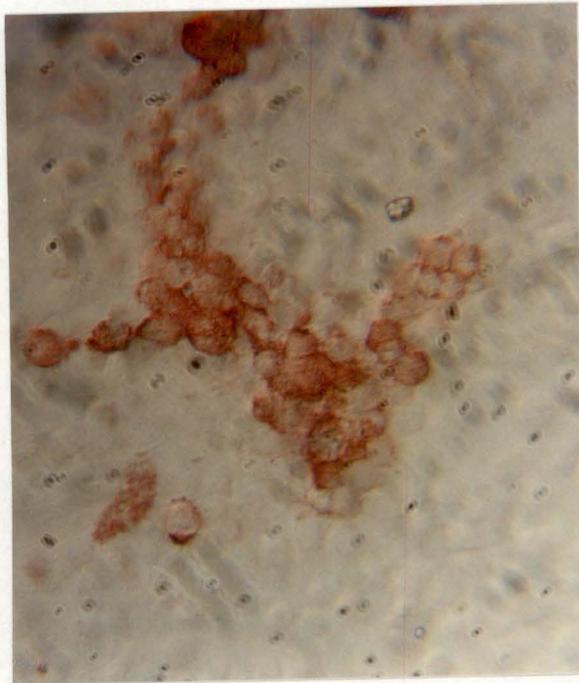


Figure 7: Photographie illustrant une observation microscopique (grossissement 200X) de la taille de syncytia qui résultent de l'infection de cellules Vero par du BRSV

VI. LA PROTEINE F

A nouveau, peu d'études ont été consacrées à la protéine F du BRSV. Mais celle-ci étant fonctionnellement et structurellement comparable à celle du HRSV, les données accumulées chez cette dernière peuvent être étendues au BRSV.

1. Rôle de la protéine F

Différents travaux ont montré que des anticorps dirigés contre la protéine F sont capables d'une part de neutraliser le pouvoir infectieux du virus et d'autre part d'inhiber, *in vitro*, la propagation du virus aux cellules voisines non infectées (Walsh *et al.*, 1984) (Walsh *et al.*, 1985) (McIntosh & Chanock, 1990).

Ces résultats montrent donc le rôle joué par la protéine F dans la fusion des membranes, permettant l'entrée du virus dans les cellules et sa propagation aux cellules adjacentes. Ce mécanisme est responsable de l'apparition des syncytia, cellules géantes multinucléées caractéristiques d'une infection par le RSV (figure 7) (Heminway *et al.*, 1994).

De cette étude, il ressort également que les protéines SH et G dans une moindre mesure, contribuent de manière indirecte à la formation des effets cytopathogènes par le virus. Les auteurs attribuent ce phénomène à une modification de la conformation de la protéine F par ces deux autres protéines. Il apparaît, en effet, que l'on puisse retrouver ces protéines associées au niveau de la membrane cellulaire (Heminway *et al.*, 1994).

2. Structure de la protéine F

2.1. Analyse de la séquence de la protéine F

La séquence nucléotidique de la protéine F du BRSV fut publiée par Walravens *et al.* (1990) et comparée à celle des souches humaines. Il apparaît que cette séquence, longue de 1723 nucléotides, code pour une protéine faisant 574 acides aminés aussi bien chez le HRSV que chez le BRSV. L'alignement de ces séquences révèle que la variabilité entre HRSV et BRSV pour

Domaines de la protéine F	RB94/RSS-2	RB94/18537	RSS-2/18537
Séquence signal	4	12	48
Sous-unité F2	67	68	86
Sous-unité F1	88	89	93
Sous-unités F1+F2	83	84	92
Protéine F entière	80	81	90

Tableau II: Pourcentages d'identité entre les séquences protéiques des différents domaines de la protéine F de souches de BRSV (RB94) et de HRSV (RSS-2 pour le sous-groupe A et 18537 pour le sous-groupe B) (d'après Walravens *et al.*, 1990)

cette protéine est beaucoup plus faible que celle observée pour la protéine G (80 à 81% sur l'ensemble de la protéine) (tableau II).

Si la protéine F est synthétisée sous forme d'un précurseur de 59 kDa, son analyse électrophorétique après maturation laisse apparaître une Masse Moléculaire de 70 kDa (Walsh *et al.*, 1985) (Lambert *et al.*, 1988). Cette différence s'explique par le fait que la protéine, lors de son processus de maturation, se voit ajouter des chaînes oligosaccharidiques.

Dans la cellule infectée; la protéine F est scindée en 2 fragments (F1 et F2) de respectivement 48 et 23 kDa (Walsh *et al.*, 1985) (Kennedy *et al.*, 1988). L'analyse de la séquence protéique de F vient confirmer les résultats de Collins *et al.* (1984) qui révélaient la présence d'un site de clivage protéolytique, conservé tant chez les souches humaines que bovines, au niveau des acides aminés 130 à 136.

A noter également la présence d'un peptide signal (résidus 1 à 25) qui sera clivé au niveau de la cystéine en position 25, et d'un site d'ancrage membranaire qui s'étend des acides aminés 525 à 550 faisant de la protéine F une protéine de type I (figure 8) (Walravens *et al.*, 1990).

2.2. Glycosylation de la protéine F

Si l'on s'attarde encore un instant sur la séquence de la protéine F, on se rend compte de la présence de 4 sites de N-glycosylation chez le BRSV. Un de ces sites est situé sur le fragment F1 tandis que les trois autres se retrouvent au niveau de F2. La situation est légèrement différente chez le HRSV, où 5 à 6 sites potentiels de N-glycosylation sont décrits en fonction des souches considérées. Ces résultats viennent confirmer les travaux réalisés par l'équipe de Lambert (1988) qui avait analysé le profil de migration électrophorétique des différents fragments soumis à des inhibiteurs de N-glycosylation.

Fait important également, le traitement avec une O-glycosidase ne vient en rien modifier la taille de la protéine, montrant ainsi l'absence de sucres O-liés sur F (Lambert *et al.*, 1988).

2.3. Oligomérisation de la protéine F

Des expériences de 'cross-linking' ont montré la présence d'homotétramères (4x(F1,2)) à la surface des cellules infectées, issus de l'association entre deux dimères de protéine F. Cette association semble être médiée par une interaction entre les différents fragments F1. Celles-ci

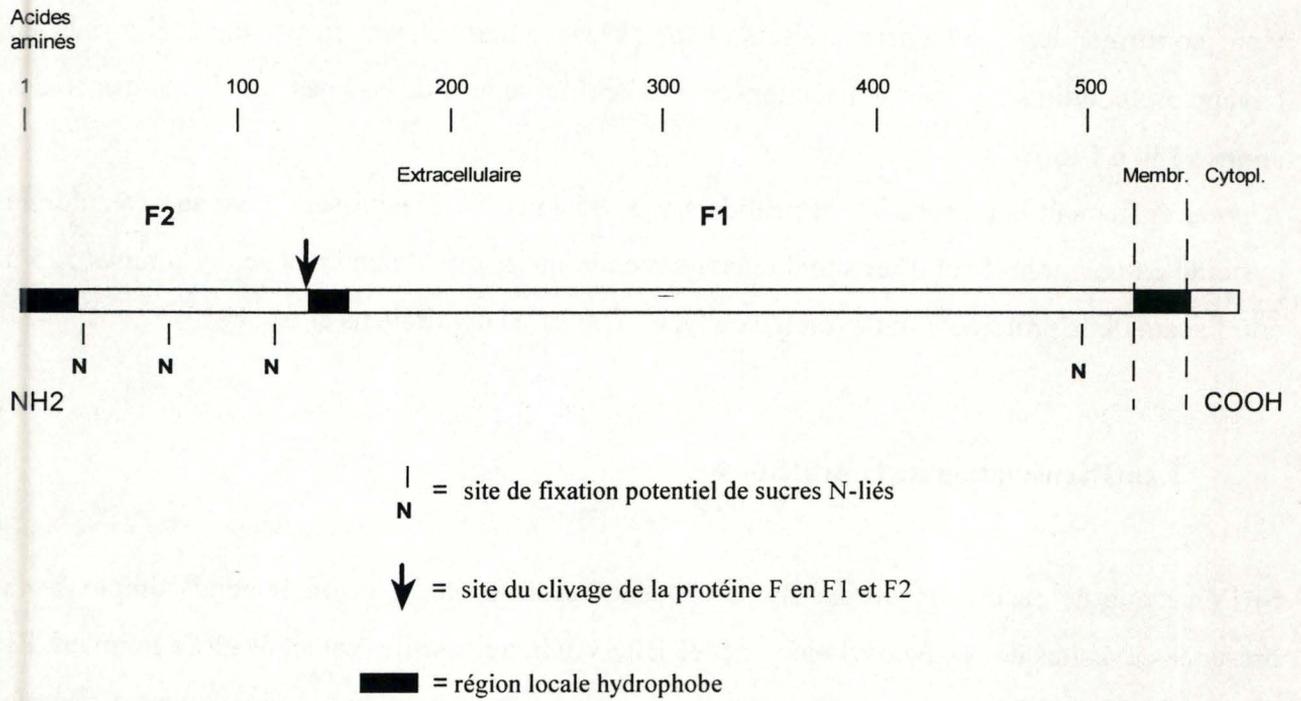


Figure 8: Représentation schématique de la protéine F du BRSV (d'après Walravens *et al.*, 1990)

formeraient le noyau de la protéine dans une configuration telle que les extrémités N-terminales s'assembleraient pour former un térapeptide fusogène. Les sous-unités F2 seraient greffées sur ce noyau et dirigées vers l'extérieur (Collins *et al.*, 1991).

A noter que des indices ont été trouvés quant à l'association entre F et G en surface des cellules infectées (Arumugham *et al.*, 1989b).

2.4. Clivage de la protéine F

Au cours de sa maturation, il se produit sur la protéine F deux clivages protéolytiques: d'une part, le clivage de la séquence signal, processus tout a fait habituel pour une protéine de type I et d'autre part le clivage de la protéine en deux fragments F1 et F2 qui restent liés via des ponts disulphures entre des résidus Cys. Cette étape est essentielle pour la génération de protéines F actives et dès lors pour la formation de virions infectieux (Anderson *et al.*, 1992) (Wang *et al.*, 1992).

Cette étape est réalisée dans le *trans*-Golgi par une endoprotéase cellulaire (Alkhatib *et al.* 1994) (Moulard *et al.*, 1995).

Le peptide de connexion, région reconnue par l'endoprotéase, sur la protéine F du BRSV est constitué de 6 acides aminés basiques (Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Arg) situés aux positions 131 à 137, le clivage se faisant entre les résidus 136 et 137. Il correspond à la séquence consensus que l'on retrouve sur la plupart des glycoprotéines virales, à savoir: Arg-X-(Lys/Arg)-Arg (Moulard *et al.*, 1995).

On ne connaît pas encore la nature exacte de ou des endoprotéases cellulaires impliquées dans le clivage protéolytique de la séquence de F, mais il apparaît que les protéases golgiennes reconnaissant ce type de motif et travaillant à pH neutre appartiennent à une famille associée aux 'subtilisin-like' endoprotéases (Moulard *et al.*, 1995).

Le clivage génère une nouvelle extrémité N-terminale très hydrophobe au fragment F1. Cette région est sans aucun doute la région impliquée dans l'interaction entre la protéine F et la membrane hydrophobe de la cellule cible, et donc dans le mécanisme de fusion (Anderson *et al.*, 1992).

2.5. Expression de la protéine F en surface

Pour que la protéine F soit transportée en surface de la cellule-hôte, il faut donc que sa maturation post-traductionnelle se soit déroulée correctement. Dans ce contexte, le clivage de F en F1 et F2 est une étape indispensable: diverses études ont en effet montré que la protéine F entière n'était pas exprimée en membrane (Anderson *et al.*, 1992) (Collins *et al.*, 1991).

De même, c'est de façon indirecte que la glycosylation affecte le transport de F, dans le sens où la présence de sucres vient modifier la conformation de la protéine et la rend ainsi susceptible au clivage par les endoprotéases (Collins *et al.*, 1991).

De par leur localisation en surface de la cellule hôte, les protéines F et G sont les cibles principales de la réponse médiée par les anticorps.

Il apparaît en outre que la protéine N présente également un fort caractère immunogène (Ward *et al.*, 1983) (Westenbrink *et al.*, 1989).

Ces anticorps peuvent constituer des outils performants tant dans les études épidémiologiques portant sur la distribution du BRSV que dans la recherche de réponses protectrices à l'égard de ce pathogène.

VII. RÔLE DES ANTICORPS LORS D'ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

Les protéines F et N étant relativement bien conservées entre les différentes souches virales, des anticorps dirigés contre ces deux protéines sont donc capables de reconnaître un large spectre de souches différentes. Ces anticorps sont ainsi utilisés dans des kits de détection afin de déceler (via des tests d'immunofluorescence ou à la peroxydase) la présence d'antigènes viraux sur des coupes de poumons ou lors des prélèvements de liquides nasaux ou trachéobronchiques.

Vu la variabilité antigénique de la protéine G, les anticorps spécifiques de cette dernière sont rarement préconisés dans le cadre de détection à grande échelle du RSV. Par contre, ces anticorps s'avèrent être des outils de choix en cas d'évaluation du type de souches impliquées dans des foyers infectieux. A ce titre, c'est principalement sur base de ces anticorps qu'a été mis en évidence l'hétérogénéité des souches, tant humaines que bovines. Il nous faut d'ailleurs souligner que le phénomène de réinfection (une des caractéristiques principales de la pathologie liée au RSV) pourrait trouver son origine dans la variabilité des souches virales.

VIII .VARIABILITE DES SOUCHES VIRALES

Avant de se pencher sur la variabilité existant au sein des souches bovines, il faut quelque peu nous attarder sur celle observée chez le HRSV. Ces études ont en effet servi de base à celles menées chez le BRSV et de plus elles permettent d'évaluer la portée relative de ce phénomène d'hétérogénéité chez le BRSV.

1. Variabilité des souches humaines

1.1.Variabilité antigénique

L'analyse du profil de réactivité de différentes souches de HRSV face à des polyséras et face à des anticorps monoclonaux, a poussé les chercheurs à répartir ces souches dans des groupes

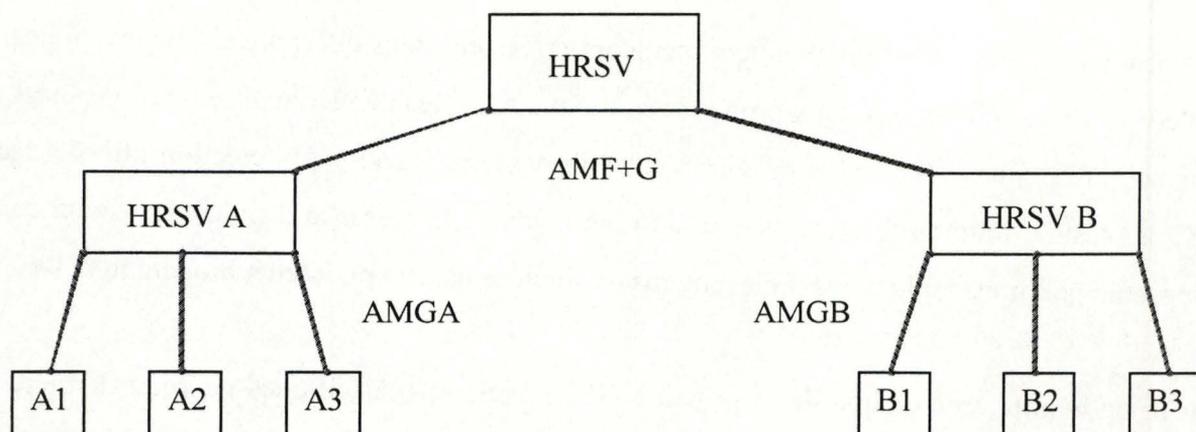


Figure 9: Classification des souches de HRSV en groupes et sous-groupes antigéniques en fonction de leur réactivité avec des anticorps monoclonaux anti-protéine F (AMF) et G (AMG)

Protéines	Groupe A	Groupe B
P	36 kDa	32-34 kDa
F	48 kDa	46-47 kDa
Produit de clivage de F1 à la trypsine	32 kDa, 23 kDa	30 kDa, 21 kDa
G	90 kDa*	90 kDa*
N	41 kDa	41 kDa
M	28 kDa	28 kDa

Tableau III : Comparaison entre les Masses Moléculaires estimées sur gel SDS-PAGE de différentes protéines issues de souches des groupes A et B. *indique une variabilité de souches à souches

antigéniques distincts. En utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines F et G principalement mais aussi contre les protéines N, P et M2, deux groupes antigéniques (A et B) ont ainsi été identifiés (Mufson *et al.*, 1985) (Anderson *et al.*, 1985) (Gimenez *et al.*, 1986) (Morgan *et al.*, 1987).

De ces études, il ressort aussi clairement que la protéine G montre beaucoup plus de variabilité que la protéine F. Dès lors, l'utilisation d'Ac. monoclonaux anti-G a permis l'identification de sous-groupes antigéniques au sein des groupes A et B. Ainsi deux sous-groupes B1 et B2 ont été définis au sein du groupe B (Akerlind *et al.*, 1988) (Orvell *et al.*, 1987). De même, les travaux de Garcia *et al.* (1994) ont permis la répartition des souches du groupe A en différents sous-groupes. La figure 9 représente le schéma de classification adopté pour les souches humaines.

1.2. Variabilité structurale

La classification des souches ne trouve pas son fondement uniquement dans des variations antigéniques mais également dans l'analyse de la mobilité électrophorétique de diverses protéines virales. Pour preuve, les résultats apportés par diverses études montrent une corrélation entre la répartition des souches en groupes antigéniques distincts et la variabilité observée dans la taille des protéines P et F1 (tableau III) (Mufson *et al.*, 1985) (Gimenez *et al.*, 1986) (Norrby *et al.*, 1986) (Walpita *et al.*, 1992) (Hierholzer *et al.*, 1994). De même, l'hétérogénéité antigénique à l'intérieur du groupe B a été confirmée en étudiant la taille des protéines G et P (Akerlind *et al.*, 1988).

1.3. Variabilité génétique

L'étude de la séquence déduite des différentes protéines virales permet de mettre également en évidence cette hétérogénéité et qui plus est, permet de la localiser surtout au niveau de la protéine G.

Celle-ci présente en effet seulement 53% d'identité en acides aminés entre les souches prototypes A2 (groupe A) et 18537 (groupe B) alors que les autres protéines du sont beaucoup plus semblables (76 à 98% d'identité (tableau IV)) (Olmsted *et al.*, 1989). L'analyse génétique de la

Protéines	HRSVA/HRSVB	Références
G	53%	Johnson <i>et al.</i> , 1987
SH	76%	Collins <i>et al.</i> , 1990
F	89%	Baybutt et Pringle, 1987; Lopez <i>et al.</i> , 1988
N	96%	Johnson et Collins, 1989
M	-	
M2	98%	Baybutt et Pringle, 1987
P	90%	Lambden <i>et al.</i> , 1985; Lopez <i>et al.</i> , 1988
NS1	92%	Johnson et Collins, 1989
NS2	87%	Johnson et Collins, 1989

Tableau IV: Comparaison entre les séquences des protéines des souches prototypes des groupes A (A2) et B (18537)

protéine G à l'intérieur de chaque groupe indique que la variabilité maximale est de 20% au sein des souches du groupe A (Cane *et al.*, 1991) et de 9% chez le groupe B (Sullender *et al.*, 1991)

Au vu de l'ensemble de ces résultats, on peut dire que la protéine F permet surtout de distinguer les deux groupes A et B, alors que la protéine G met plutôt en évidence la variabilité existant à l'intérieur de ces sous-groupes.

Notons qu'au niveau du groupe A, certains virus isolés à la même époque dans des endroits forts variés du globe se ressemblent beaucoup, alors que d'autres virus isolés au même endroit, durant la même épidémie, peuvent présenter des caractéristiques antigéniques très distinctes. Il apparaît donc que ces virus ont acquis un mode d'évolution qui permet d'une part l'émergence de nouveaux variants échappant à la réponse immunitaire de l'hôte et d'autre part leur dissémination aux quatre coins de la planète (Garcia *et al.*, 1994).

A noter enfin que le degré de sévérité de la maladie n'est généralement pas associé à la présence d'un groupe particulier (Hendry *et al.*, 1986) (McIntosh *et al.*, 1993). Malgré cela, certains groupes ont suggéré qu'une infection avec des souches du groupe A pourrait engendrer une proportion plus importante de cas nécessitant des soins intensifs (Hall *et al.*, 1990) (Mufson *et al.*, 1991).

La découverte de cette variabilité parmi les souches de HRSV a posé la question de savoir si pareil phénomène existe également chez le BRSV

2. Variabilité des souches bovines

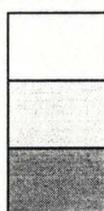
2.1. Variabilité antigénique

L'utilisation de polyclonaux et de monoclonaux dirigés contre la protéine G du BRSV a permis l'identification par le groupe de Taylor (confirmée via les travaux réalisés dans notre laboratoire) de deux groupes antigéniques distincts (A et B) ainsi que d'un troisième (A/B), intermédiaire

Souches	Anticorps Monoclonaux							"Groupes"	M _r F2 (kiDa)
	48	52	20	57	61	70	AK13A2		
NMK7 (Japon)	■	■	■	■	□	□	■	A	17
85-1330 (USA)	■	■	■	■	■	□	■	A	ND
FS-1 (USA)	■	■	■	■	■	□	■	A	15.5 ^a
A51908 (USA)	□	■	□	□	■	□	■	A	20 ^a
RB94 (Belgique)	■	■	■	□	□	■	■	A/B	23
Lelystad (Hollande)	■	■	■	□	□	■	■	A/B	23
MVR553 (Belgique)	■	■	■	□	□	■	■	A/B	ND
BovX (Suisse)	□	□	□	□	□	■	■	B	23
WBH (Hollande)	□	□	□	□	□	□	■	ND	ND

Tableau V: Classification des souches de BRSV en "groupes" antigéniques sur base de leur réactivité avec des Ac. Mon. en immunofluorescence et de la Masse Moléculaire de leur sous-unité F2 (d'après Furze *et al.* , 1994; Prozzi *et al.* , 1996).

Critères de réactivité des Ac. Mon. en immunofluorescence:



□ négatif

□ signal faible pour une dilution d'Ac. Mon. à 1/10

■ signal maximal pour une dilution d'Ac. Mon. supérieure à 1/1000

ND: non déterminé.

^a Mallipedi et Samal, 1993

(tableau V). Une des souches étudiées, la WBH, ne répond pas aux critères de classification établis et a dès lors été considérée comme 'atypique' (Furze *et al.*, 1994) (Prozzi *et al.*, in press).

2.2. Variabilité structurale

Cette classification au niveau antigénique a également pu être corroborée par l'analyse structurale de certaines protéines virales.

Ainsi la sous-unité F2 a une taille plus faible chez les souches du groupe A que chez celles du groupe B. De même, des variations de taille au niveau de la protéine P ont été observées entre ces différents groupes.

(Baker *et al.*, 1992) (Mallipeddi *et al.*, 1993a) (Furze *et al.*, 1994) (Prozzi *et al.*, in press).

2.3. Variabilité génétique

Les travaux de Prozzi *et al.* (in press) sont venus apporter une confirmation de cette variabilité chez le BRSV et ce, en comparant la séquence déduite de la protéine G de différentes souches représentatives. Cependant, les résultats obtenus montrent que le pourcentage de substitution observés entre les souches des groupes A, A/B et la souche BovX du groupe B, n'excède pas 10%. Ce pourcentage est très faible en comparaison de celui obtenu entre les groupes A et B du HRSV (47%). Les résultats obtenus ici chez le BRSV font plutôt penser à de la variabilité intra-groupe, semblable à celle observée chez le HRSV (20% à l'intérieur du groupe A et 9% pour B).

Cela peut s'expliquer par le fait que chez le BRSV, à l'heure actuelle, on ne dispose pas d'anticorps discriminants autres que ceux dirigés contre la protéine G ayant servis à l'identification des 'groupes' antigéniques. Or, chez le HRSV, les groupes A et B ont été identifiés sur base d'anticorps monoclonaux discriminants dirigés contre les protéines F, M, N, et P, les anticorps anti-G ayant surtout servi à la différenciation de sous-groupes au sein de ces groupes. Ainsi, selon le schéma de classification établi pour les souches humaines, les 'sous-groupes' A, A/B et B du BRSV pourraient donc faire partie d'un même 'groupe' antigénique, ceci restant encore très hypothétique. Peut-être n'existe-t-il pas de groupes chez le BRSV pareils à ceux rencontrés chez le HRSV ou bien les outils dont on dispose actuellement ne permettent pas leur identification. Mais, s'ils existent réellement, les souches atypiques pourraient constituer, en

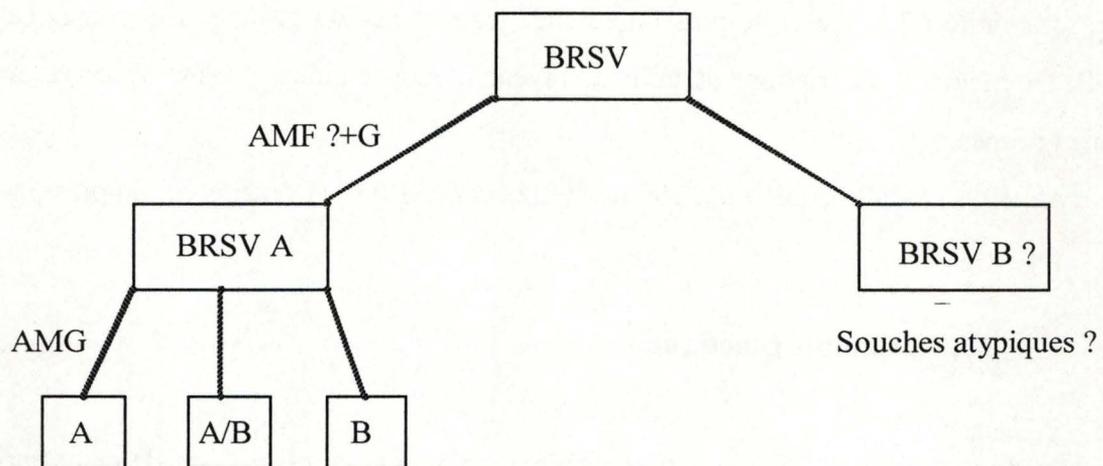


Figure 10: Classification hypothétique des souches de BRSV en 'groupes' et 'sous-groupes' antigéniques établie en fonction de la réactivité de certains anticorps monoclonaux anti-protéine G (AMG) et d'une correspondance éventuelle avec la situation existant chez le HRSV.

fonction de leur plus grande variabilité, une piste intéressante à exploiter dans la recherche de groupes antigéniques distincts (figure 10).

Quoiqu'il en soit, cette hétérogénéité chez le BRSV est bien présente et on peut alors se demander quel en est l'impact épidémiologique. Dans ce contexte, les travaux menés par dans notre laboratoire ont permis d'évaluer la portée épidémiologique de cette variabilité en montrant que durant les hivers 1992-94, en Belgique, il y avait bel et bien co-circulation des souches des 'groupes' A, B et A/B (Walravens *et al.*, résultats non publiés). L'évaluation des conséquences de cette variabilité sur la réponse immunitaire et principalement sur la réponse protectrice est actuellement en cours dans notre laboratoire, notamment en regardant si la vaccination ou l'infection naturelle par une souche de BRSV est capable d'engendrer une réponse croisée à l'égard de souches bovines hétérologues

IX. RÔLE DES ANTICORPS ANTI-F ET ANTI-G DANS LA PROTECTION

1. La réponse protectrice

L'immunisation de souris ou de rats cottons avec des protéines purifiées a permis de mettre en évidence la capacité qu'ont les protéines F et G à engendrer une réponse inhibant la réplication du virus dans les poumons lors d'un test de résistance à l'infection (Walsh *et al.*, 1987) (Routledge *et al.*, 1988) (Murphy *et al.*, 1989) (Murphy *et al.*, 1990). Pareils résultats ont aussi été obtenus grâce à l'injection de protéines F et G recombinantes, exprimées en baculovirus ou dans le virus de la vaccine et ce, qu'elles proviennent du HRSV (Elango *et al.*, 1986) (Olmsted *et al.*, 1986) (Stott *et al.*, 1986) (Wertz *et al.*, 1986) ou du BRSV (Walravens *et al.*, in press).

Il apparaît en outre que la réponse induite par la protéine F est plus durable que celle engendrée par G (Johnson *et al.*, 1987). La protéine F est aussi capable d'induire une forte protection à la fois contre des souches homologues et hétérologues tandis que la protéine G induit une plus faible protection contre des souches homologues et pas du tout contre des souches hétérologues (Stott *et al.*, 1987) (Sullender *et al.*, 1990)

Enfin, la déplétion de certaines populations cellulaires '*in vivo*' chez la souris a permis d'associer cette réponse protectrice à la production d'anticorps dirigés contre les protéines F et G (Connors *et al.*, 1991) (Connors *et al.*, 1992).

2. Transfert passif des anticorps

Un moyen efficace d'évaluer le rôle exact des anticorps dans la protection consiste à transférer passivement un sérum à un animal et d'en étudier la résultante protectrice suite à une infection par le RSV. De cette façon on a pu montrer que des anticorps anti-F ou anti-G sont capables de protéger des souris contre le développement du RSV dans leurs poumons (Taylor *et al.*, 1984) (Kennedy *et al.*, 1988) (Trudel *et al.*, 1991) (Taylor *et al.*, 1992).

A ce titre, plusieurs essais cliniques chez des enfants ont montré l'efficacité de l'injection prophylactique et thérapeutique de séra hyperimmuns en matière de réduction du titre viral dans les poumons (Hemming *et al.*, 1987) (Groothuis *et al.*, 1991).

3. Les anticorps neutralisants

L'activité protectrice de ces anticorps paraît associée à une capacité fonctionnelle décelable *in vitro*. Ainsi, seuls les séras montrant une haute capacité à inhiber l'infection de cellules en culture par le virus permettent une protection efficace *in vivo* (anticorps neutralisants) (Siber *et al.*, 1992).

Diverses études tant chez l'homme que chez le bovin, ont montré que la protéine G induit peu d'anticorps neutralisants et généralement ces anticorps n'inhibent pas complètement la réplication virale (Taylor *et al.*, 1984) (Anderson *et al.*, 1988). Par contre beaucoup d'anticorps dirigés contre la protéine F neutralisent complètement le virus, (Kennedy *et al.*, 1988) (Taylor *et al.*, 1992) (Mulkey and Anderson, 1991) (Arbiza *et al.*, 1992). Ces résultats peuvent expliquer le fait qu'on ait moins d'anticorps protecteurs anti-G qu'anti-F.

L'effet neutralisant peut trouver son origine dans des mécanismes distincts selon qu'il implique l'une ou l'autre de ces protéines. Ainsi des tests *in vitro* ont révélés que les anticorps anti-G exercent leur pouvoir neutralisant en inhibant l'attachement du virus à la cellule hôte alors que les anti-F agissent en inhibant la fusion des membranes. Si peu d'études ont été consacrées à

l'activité fonctionnelle des anti-G, deux types d'anticorps monoclonaux neutralisants dirigés contre la protéine G ont été décrits. D'une part des anticorps neutralisants peuvent empêcher l'entrée du virus par leur fixation à des épitopes directement impliqués dans la fusion. D'autre part, l'existence d'anticorps neutralisants ne présentant pas d'activité inhibitrice de fusion décelable *in vitro*, laisse penser que ceux-ci peuvent perturber de manière indirecte l'entrée du virus dans la cellule (en interférant par exemple avec l'attachement médié par la protéine G) (Taylor *et al.*, 1992).

Tous les anticorps inhibiteurs de fusion sont donc neutralisants, l'inverse n'étant pas nécessairement vrai.

Il apparaît que seuls des anticorps monoclonaux hautement neutralisants sont capables d'inhiber la fusion (Walsh *et al.*, 1986) (Kennedy *et al.*, 1988) (Beeler *et al.*, 1989) (Matheise *et al.*, 1995). De même, malgré l'impact favorable que peut avoir la neutralisation, une protection efficace contre l'infection est plutôt corrélée avec un pouvoir inhibiteur de fusion que neutralisant des anticorps (Taylor *et al.*, 1992)

Ainsi donc, les protéines F et G jouent un rôle dans la protection immune, mais la contribution de F est plus importante à la fois pour les phénomènes de neutralisation *in vitro* et de protection *in vivo*.

Ces anticorps constituent donc d'excellents outils permettant l'identification de certaines zones des protéines F et G impliquées dans le mécanisme d'infection du virus.

X. Analyse antigénique des protéines F et G

1. Introduction

Les objectifs de cette analyse antigénique sont différents selon qu'elle implique la protéine F ou la protéine G. En effet, dans le premier cas, les anticorps anti-F ont jusqu'à présent servi principalement à localiser les épitopes protecteurs sur cette protéine. Les anticorps monoclonaux anti-G peuvent aussi mettre en évidence des zones importantes pour la protection, mais en regard

de la grande variabilité de G, ils sont surtout exploités dans le cadre de l'analyse des zones variables à la base de l'hétérogénéité des souches du RSV.

L'analyse antigénique des protéines F et G se déroule généralement en deux étapes distinctes: on procède dans un premier temps à des tests de compétition afin d'identifier les différents régions antigéniques de la protéine et ensuite, via des stratégies très diverses, on peut localiser les épitopes présents dans ces régions.

1.2. Identification des régions antigéniques

Le test de compétition consiste à évaluer la capacité qu'ont des anticorps monoclonaux à entrer en compétition pour leur fixation à un même épitope ou à des épitopes proches topographiquement. Si deux anticorps monoclonaux inhibent mutuellement leur liaison à l'antigène, les épitopes reconnus par ces deux anticorps monoclonaux seront classés dans un même site antigénique.

1.3 Localisation des épitopes

Il existe de nombreuses techniques permettant une localisation plus précise des épitopes d'une protéine. Une de ces techniques, éprouvée à de nombreuses reprises en matière de RSV, consiste à sélectionner à l'aide d'anticorps neutralisants, des 'antibodies escape mutants', souches virales chez lesquelles une mutation affecte la reconnaissance par les anticorps concernés. La localisation de cette mutation permet de situer la zone reconnue par les anticorps sur la souche sauvage.

D'autres techniques couramment utilisées consistent à tester ces anticorps sur des fragments protéolytiques ainsi que sur des peptides synthétisés chimiquement ou exprimés sous forme recombinante.

2. Analyse antigénique de la protéine F

2.1 Identification des régions antigéniques

2.1.1. Chez le HRSV

Les tests de compétitions réalisés par différents laboratoires définissent en général quatre à cinq sites antigéniques distincts sur la protéine de fusion du HRSV (Walsh *et al.*, 1986) (Garcia-Barreno *et al.*, 1989) (Beeler *et al.*, 1989) (Arbiza *et al.*, 1992) (Taylor *et al.*, 1992). Il est difficile d'établir une correspondance entre les régions antigéniques découvertes par chaque équipe, vu qu'elles ont toutes travaillé en utilisant leur propre panel d'anticorps. Toutefois, les études menées par le groupe de Melero, à partir d'anticorps provenant de plusieurs laboratoires, ont permis de définir deux sites neutralisants regroupant plusieurs épitopes reconnus par des anticorps fortement neutralisants et inhibiteurs de fusion: le site majeur de neutralisation II et le site mineur de neutralisation IV (Arbiza *et al.*, 1992).

2.1.2 Chez le BRSV

Au niveau du BRSV, les travaux de Trudel *et al.* (1989) ont permis l'identification d'au moins trois sites reconnus par des anticorps monoclonaux neutralisants que reconnaissent les souches humaines, bovines et ovines du RSV. Les résultats acquis au sein de notre laboratoire par Matheise *et al.* (1995) permettent de définir également deux régions antigéniques (A et B) ainsi qu'une troisième AB. Qui plus est, les régions A et B sont reconnues par des anticorps neutralisants et inhibiteurs de fusion, identifiant ainsi deux régions distinctes et biologiquement actives sur la protéine F du BRSV. Enfin, l'équipe de Langedijk a localisé également trois sites différents sur la protéine F, dont deux (les sites A et B) sont reconnus par des anticorps neutralisants (Langedijk *et al.*, résultats non publiés).

2.1.3. Localisation des épitopes sur la protéine F

2.1.3.1. Chez le HRSV

L'utilisation de peptides synthétiques et de fragments recombinants de la protéine F exprimés en bactéries indiquent que la zone 289 à 298 est importante pour la fixation d'un anticops (L4) inhibiteur de fusion (Paradiso *et al.*, 1991) (Martin-Gallardo *et al.*, 1991).

D'autre part, l'expression de fragments protéiques en bactéries par Lounsbach *et al.* (1993) a également permis de montrer que des anticorps neutralisants et inhibiteurs de fusion se fixent au niveau des acides aminés 253 à 289 de la protéine F.

Ces résultats sont intéressants, mais ils sont le fruit de recherches isolées. Une étude beaucoup plus complète, regroupant différents laboratoires, s'est intéressée à la localisation d'épitopes reconnus par différents anticorps sur les sites de neutralisations II et IV.

Ainsi, une localisation grossière des sites de neutralisation II et IV a d'abord été réalisée en testant les anticorps spécifiques de ces sites sur des fragments protéolytiques de la protéine F du HRSV. Les résultats de cette expérience identifient la région II au niveau du premier tiers de la région N-terminale de la sous-unité F1 tandis que la région IV se situe elle au niveau des deux tiers de l'extrémité carboxy -terminale de cette même sous-unité (Arbiza *et al.*, 1992).

L'utilisation des 'antibodies escape mutants' a permis de confirmer ces résultats. En effet, sur base de l'analyse de la séquence déduite de la protéine F chez ces mutants, il est apparu que les résidus 262, 268 et 272 sont impliqués dans la formation d'épitopes distincts au niveau de la région II. Au niveau du site IV, la fixation d'anticorps monoclonaux semble relativement dépendante de la présence de l'acide aminé 429. Ce dernier résultat a été confirmé directement par la reconnaissance d'un peptide synthétique (422-437) par les anticorps du site IV. (Arbiza *et al.*, 1992).

Toutefois, l'utilisation de peptides courts trouve ses limites dans le cas d'épitopes un peu plus complexes, comme ceux qui semble constituer le site II.

Ainsi, en testant les différents anticorps assignés à ce site sur des courts peptides synthétiques, l'équipe d'Arbiza s'est rendue compte qu'un seul des anticorps (le B4) est capable de réagir avec un peptide recouvrant les résidus 255 à 275 (Arbiza *et al.*, 1992). Les autres anticorps (dont l'AK13A2 produit dans notre laboratoire) nécessitent en effet un peptide plus long, allant des résidus 215 à 275 ou des résidus 235 à 275. Il existe donc une structure minimale dans ces 60 acides aminés permettant la reconnaissance des épitopes par ces anticorps (Lopez *et al.*, 1993).

2.1.3.2. Chez le BRSV

Un nombre beaucoup plus restreint d'études s'est intéressé à la localisation des épitopes de la protéine F du BRSV.

Toutefois la forte homologie qui existe entre les souches humaines et bovines, d'un point de vue antigénique, permet l'exploitation de certains résultats obtenus chez le HRSV.

Ainsi, plusieurs anticorps monoclonaux reconnaissant les sites II et IV sont spécifiques des souches humaines et bovines (Taylor *et al.*, 1992).

Les tests réalisés au sein de notre laboratoire par Matheise *et al.* (résultats non publiés) à l'aide de fragments protéolytiques ou exprimés en bactérie de la protéine F, confirment que la zone comprise entre les résidus 251 à 285, correspondant donc à la région II décrite par Arbiza, est le siège d'une réponse neutralisante importante chez le BRSV.

Un autre domaine de la protéine a aussi été identifié en faisant réagir de courts peptides fixés à un support solide (technique du PEPscan). Il s'agit d'un site de neutralisation conservé tant au niveau des souches humaines que bovines et situé au niveau de l'extrémité N-terminale du fragment F1 (résidus 173 à 182) (Langedijk *et al.*, résultats non publiés).

3. Analyse antigénique de la protéine G

La seule étude utilisant des anticorps en test de compétition sur la protéine G, réalisée par Garcia-Barreno *et al.* (1988), n'a pas permis d'établir une classification des régions antigéniques comparable à celle obtenue pour la protéine F. En effet, alors que pour celle-ci on arrive à localiser quelques régions antigéniques distinctes, il apparaît qu'au niveau de la protéine G presque chaque anticorps testé identifie un site unique, la plupart de ces sites se chevauchant fortement.

L'identification des sites antigéniques posant problème, les études se sont consacrées directement à la localisation des épitopes sur la protéine.

La classification des épitopes de la protéine G peut se faire sur base de leur variabilité ou en fonction de leur structure. Dans le premier cas, on les répartira en épitopes conservés, spécifiques des groupes viraux et variables à l'intérieur de ces groupes, alors que dans le second cas on distinguera les épitopes sucrés des non-sucrés.

A nouveau, très peu d'études ont été consacrées à l'antigénicité de la protéine G des souches bovines, comparativement à celles des souches humaines. Qui plus est, cette protéine présentant une hétérogénéité antigénique importante, les résultats obtenus au niveau du HRSV sont

difficilement exploitables chez le BRSV. Il en ressort toutefois certaines caractéristiques intéressantes:

3.1. Classification des épitopes en fonction de leur variabilité

3.1.1. Epitopes conservés

L'utilisation d'anticorps reconnaissant toutes les souches du HRSV a permis d'isoler des 'escape mutants' chez lesquels les mutations ont été localisées au niveau d'une des Cys présentes dans l'ectodomaine de G. Pour rappel, ces Cys sont totalement conservées entre toutes les souches virales, tant humaines que bovines, suggérant ainsi leur implication dans un épitope important (Rueda *et al.*, 199'). Ces résultats sont venus renforcer les convictions de Johnson *et al.* (1987b) qui prédisaient l'importance d'un court fragment conservé s'étalant entre les résidus 164 et 176 et chevauchant la région riche en cystéines dans le rôle d'attachement de la protéine.

Enfin, un anticorps monoclonal neutralisant spécifique de toutes les souches de HRSV reconnaît un peptide recouvrant la région 205-211 (Garcia-Barreno *et al.* , 1989).

3.1.2. Epitopes spécifiques des groupes viraux

Un site antigénique situé dans la région centrale hydrophobe (au niveau des acides aminés 174 à 188) a été identifié et caractérisé par différentes équipes (Norrby *et al.*, 1987) (Akerlind-Stopner *et al.*, 1990). Il apparaît que cette région est conservée à l'intérieur des groupes A et B du HRSV, mais pas entre ces 2 sous-groupes (Trudel *et al.*, 1991). Fait intéressant, l'équipe de Trudel (Trudel *et al.*, 1991) a montré que l'immunisation avec un peptide synthétique recouvrant la région 174-187 est capable d'induire une réaction de protection à l'encontre de souches homologues.

Ces résultats ont été corroborés par Rueda *et al.* (1995) en montrant que des épitopes spécifiques des groupes, au même titre que des épitopes conservés, sont localisés au niveau de la région à cystéines.

On a découvert plus tard que pareille région immuno-dominante existe non seulement au niveau du HRSV mais aussi chez le BRSV (Langedijk *et al.*, in press. b). Dans les travaux de Furze *et*

al. (1994) l'utilisation d'un anticorps monoclonal (20) assigné à cette région antigénique, permet la discrimination des différents groupes viraux du BRSV. Cet anticorps reconnaît en effet le peptide 174-185 chez les souches des groupes A et A/B, mais pas chez les souches du groupe B. Cette différence de réactivité pourrait s'expliquer par la présence de 2 mutations (résidus Pro 180 et 184) au niveau des souches B (Langedijk *et al.*, in press. a) (Prozzi *et al.*, in press).

Bien qu'aucun rôle majeur dans la réponse protectrice, tant chez le HRSV que chez le BRSV, n'ait été attribué à cette région, ces résultats montrent cependant son implication dans l'hétérogénéité des souches virales et dès lors la pertinence d'une classification basée sur la variabilité antigénique

3.1.3. Epitopes spécifiques des souches

L'utilisation d'«escape mutants» par l'équipe de Melero (Rueda *et al.*, 1991) révèle que la majorité des épitopes spécifiques des souches du HRSV se localisent au niveau de l'extrémité carboxy-terminale de la protéine. D'après les travaux de Cane *et al.* (1996) sur les souches du groupe A, cette région C-terminale paraît très immunogène et ce en dépit de sa forte variabilité. L'implication de ce domaine C-terminal dans une réponse fonctionnellement importante *in vivo* semble néanmoins sujette à caution puisqu'une protéine G amputée des 68 derniers aminés induit une réponse protectrice comparable à celle obtenue avec le virus sauvage (Olmsted *et al.*, 1989).

La localisation des sites antigéniques sur la protéine G peut donc se résumer en disant d'une part que les épitopes spécifiques des souches sont localisés au niveau du tiers de l'extrémité C-terminale tandis que les épitopes spécifiques des groupes antigéniques et conservés se situent tous deux aux alentours du cluster de cystéines de l'ectodomaine. La conservation de ce cluster et des régions avoisinantes parmi les différentes souches virales ainsi que leurs rôles supputés expliqueraient la préservation des épitopes localisés à ce niveau de la protéine (Rueda *et al.*, 1995).

Ces résultats sont toutefois nuancés par les travaux de Sullender *et al.* (1995) montrant que les trois régions de la protéine G (régions N-terminale (1-173), centrale à cystéines (174-214) et C-terminale (215-298)) sont capables d'être reconnues par des anticorps neutralisants spécifiques de groupes distincts de HRSV.

3.2. Classification des épitopes en fonction de leur structure

La classification des épitopes abordée ci-dessus est arbitrairement basée sur leur variabilité, mais elle ne préjuge en rien de leur structure. En effet, la plupart des techniques utilisées dans la localisation de ces épitopes, à l'exception des peptides synthétiques, mettent en évidence l'importance de certains résidus pour la reconnaissance des anticorps, mais ne permettent pas de déterminer la structure minimale reconnue par les anticorps monoclonaux.

Certains travaux ont identifié sur la protéine G deux types d'épitopes: les sucrés et les non-sucrés. Ainsi, les travaux de Palomo *et al.* (1991) montrent que la grande majorité des anticorps reconnaissent des épitopes O-glycosylés sur la protéine G, soulignant à nouveau l'importance de ces sucres pour son antigénicité. Grâce à l'expression de la protéine G en bactéries, l'équipe de Gallardo (Gallardo *et al.*, 1993) a néanmoins identifié un épitope neutralisant dont la structure est indépendante de chaînes hydrocarbonées.

**BUT DU
TRAVAIL**

BUT DU TRAVAIL

Les protéines F et G constituent des éléments essentiels au niveau du pouvoir infectieux du BRSV. Qui plus est, de par leur situation en surface de ce virus, ces deux protéines forment d'excellentes cibles pour les anticorps produits lors de la réponse immunitaire humorale chez un individu infecté. Dès lors, ces anticorps peuvent constituer des outils relativement intéressants, d'une part dans la recherche de réponses protectrices à l'égard de ce virus et ensuite pour les études épidémiologiques portant sur la distribution des souches du BRSV.

C'est dans cette optique que notre travail a eu pour but de produire et de caractériser des anticorps monoclonaux dirigés contre ces deux protéines.

Disposant déjà d'un anticorps dirigé contre la protéine F du RSV n'ayant été caractérisé que grossièrement par le passé, la première partie de ce travail se focalisera donc sur la production d'anticorps monoclonaux ciblés sur la protéine G de ce virus. –

Les différents anticorps (anti-protéine F et anti-protéine G) seront ensuite caractérisés selon deux modalités.

Ainsi, dans un premier temps il nous faudra étudier la fonctionnalité de ces anticorps et donc leur capacité à inhiber le pouvoir infectieux du virus.

Ensuite, la réactivité de chacun de ces anticorps sera évaluée sur un panel de souches virales, de manière à montrer le caractère discriminant ou conservé de nos anticorps monoclonaux et à déterminer le rôle qu'ils pourraient jouer lors d'études épidémiologiques.

Nous tenterons enfin de localiser la région antigénique reconnue par chacun de ces anticorps sur la protéine F ou sur la protéine G.

RESULTATS

RESULTATS

Disposant déjà au laboratoire d'anticorps dirigés contre la protéine F du BRSV, nous avons concentré l'essentiel de nos efforts sur la production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine G de ce même virus.

Le travail accompli durant ce mémoire s'est déroulé en deux phases distinctes. Dans un premier temps, on a cherché à produire ces anticorps monoclonaux. Ensuite, ceux-ci ont été caractérisés de manière plus approfondie quant à leurs spécificités fonctionnelles et antigéniques.

CHAPITRE I. PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX

1. Préambule

La technique utilisée repose sur l'obtention d'hybridomes issus de la fusion entre des lymphocytes B sécrétant d'anticorps (plasmocytes) et des cellules de myélome (cellules cancéreuses issues de la lignée B).

Chaque hybridome garde les caractéristiques des deux types de cellules parentales, si bien qu'après une étape de clonage il sera capable de produire et de sécréter indéfiniment un seul type d'anticorps (anticorps monoclonal) dirigés contre un déterminant antigénique (ou épitope) unique.

Les plasmocytes utilisés pour produire les anticorps anti-protéine G sont issus de la rate de souris préalablement immunisées avec cette protéine.

2. Préparation de la protéine G

La protéine G utilisée principalement pour immuniser les souris a été obtenue par purification à partir de cultures virales de la souche RB94 sur cellules Vero. Cette purification reposant sur le principe de la chromatographie d'affinité, consiste à déposer un lysat de virus sur une colonne de Sépharose couplée à un anticorps dirigé contre la protéine G du BRSV (l'anticorps 20). Une fois le lysat passé, l'élution de cette colonne permet la récupération de la protéine G purifiée.

A noter que la même technique a été appliquée pour purifier la protéine F, moyennant l'utilisation d'un anticorps dirigé contre cette dernière.

Malgré les aménagements apportés au protocole, le rendement de la purification reste assez faible. Cette efficacité limitée peut être imputée à la quantité restreinte de protéine virale présente dans la préparation à la base de la purification. La réplication à haut titre du BRSV reste en effet problématique en matière de production d'antigènes viraux.

Ceci encourage l'utilisation d'un autre système de production de la protéine G.

A ce titre, le baculovirus s'est avéré être d'une plus grande efficacité. Il s'agit en effet d'un vecteur viral se développant très bien en culture et permettant l'expression en grandes quantités de protéines recombinantes (20 à 100 $\mu\text{g}/10^7$ cellules) (Matsuura *et al.*, 1988)

Ne disposant pas au laboratoire de baculovirus exprimant la protéine G (Bac-G) de la souche RB94, nous nous sommes tournés vers l'utilisation de la protéine G du virus NMK7 exprimée dans ce même vecteur baculovirus. Même si quelques différences antigéniques sont perceptibles entre ces deux souches, l'analyse de la séquence de ces deux protéines montrent plus de 90 % d'identité (Prozzi *et al.*, in press).

Le baculovirus a été cultivé sur de cellules sf9, cette préparation ayant servi à la fois pour la dernière stimulation de la souris utilisée lors de la première fusion ainsi que pour les différents tests antigéniques réalisés.

Un vecteur analogue mais exprimant la protéine F de la souche RB94 a également servi lors des tests antigéniques.

3. Immunisation des souris

Trois souris Balb/c ont été immunisées par voie sous-cutanée avec de la protéine G purifiée, issue de la souche bovine RB94. Sur chacune de ces souris, trois rappels ont été effectués avec cette même protéine adjuvantée en Quil-A (saponine extraite de *Quillaya saponaria*) à environ 6 semaines d'intervalles et à raison de 10 μg par injection.

Après immunisation, un prélèvement sanguin de chaque souris a été effectué.

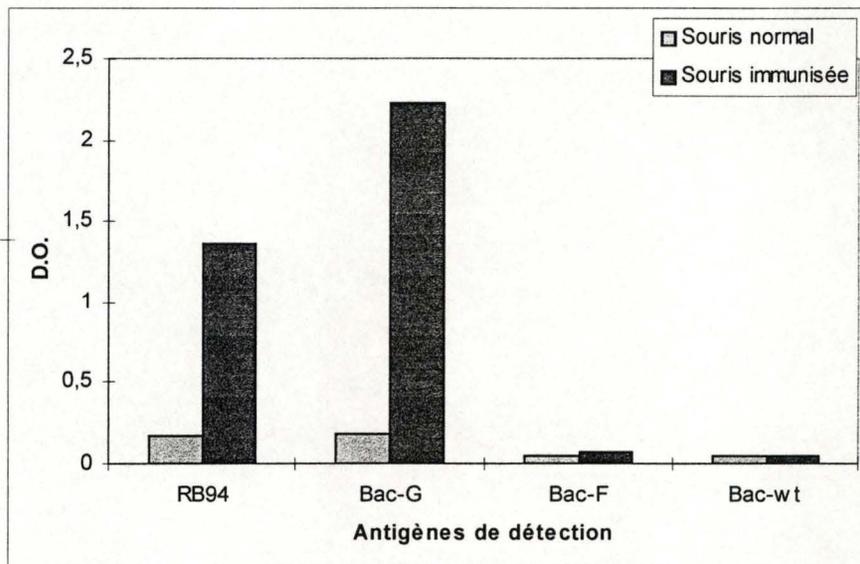


Figure 11: Réactivité du serum (dilué 50x) d'une souris immunisée à l'aide de protéine G en ELISA indirect sur différents antigènes

3.1. Evaluation de la spécificité des sera

Le serum des souris immunisées après le deuxième rappel a été testé en ELISA indirect de manière à vérifier la production par ces souris d'anticorps dirigés contre la protéine G.

La réactivité des sera a été réalisée sur quatre antigènes différents, à savoir:

- des cellules infectées par le virus RB94
- des cellules infectées par le Bac-G
- des cellules infectées par le baculovirus exprimant la protéine F du RB94 (Bac-F).
- des cellules infectées par le baculovirus sauvage (Bac-wt), ces deux derniers servant de

témoin négatif. Le mode de préparation de cet antigène est le même que pour le Bac-G.

Différentes dilutions des séra ont été déposées sur ces quatre antigènes préalablement adsorbés sur une plaque-multipuits. Le serum d'une souris non-immunisée a également été testé en guise de témoin négatif de la réactivité sur ces antigènes.

La présence d'anticorps fixés est révélée en immunoperoxydase (cfr. Mat. & Méth.)

3.2. Résultats

La figure 11 donne un exemple de la réactivité d'un des sera (dilué 50 X) testé sur les différentes préparations d'antigènes.

Les résultats obtenus rendent compte d'une réactivité du serum de la souris immunisée à trois reprises sur le virus entier, au contraire du serum de souris non immunisée qui est également négatif sur les autres préparations d'antigènes. Par contre, le serum de souris immunisée réagit clairement avec le Bac-G mais pas sur le Bac-F et le Bac-wt, suggérant dès lors la production d'anticorps anti-protéine G par cette souris.

Pareils résultats furent obtenus avec les sera des autres souris.

4. Première Fusion

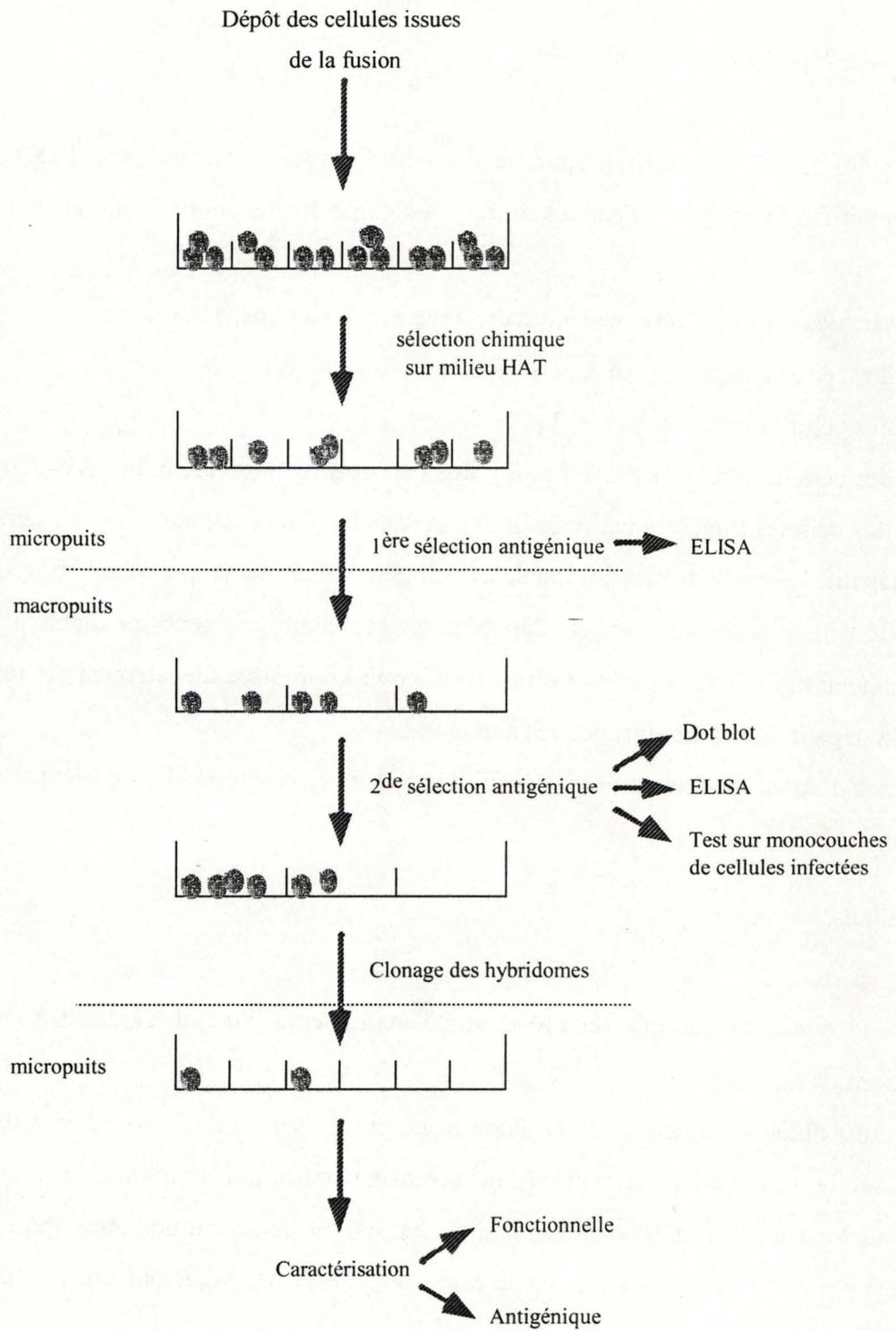


Figure 12: Représentation schématique des différentes étapes de sélection des hybridomes

Juste avant la fusion, une des souris immunisée précédemment a subi deux injections par voie sous-cutanée de Bac-G, adjuvanté en Quil-A. Cette étape est nécessaire pour stimuler la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sécréteurs d'anticorps.

Après avoir réalisé la fusion (selon le protocole décrit dans la partie *ad hoc* du Mat. & Méth.), les cellules ont été réparties dans dix plaques multipuits.

En référence à la terminologie en vigueur dans notre laboratoire, cette fusion a reçu le nom de CL.

Après une dizaine de jour de culture, une sélection basée sur des tests antigéniques a permis l'élimination des hybridomes ne sécrétant pas d'anticorps ou sécrétant des anticorps non ciblés sur la protéine G.

Pour la clarté de l'exposé, la figure 12 reprend les différentes étapes de la sélection des hybridomes producteurs.

4.1. Première sélection des hybridomes

Les surnageants issus de la culture de chaque hybridome et contenant les anticorps sécrétés par ceux-ci ont été testés en ELISA indirect de manière à évaluer leur réactivité sur trois antigènes différents.

Les antigènes de détection utilisés au cours de ce test sont:

- des cellules infectées par le RB94
- des cellules infectées par le Bac-G
- des cellules infectées par le Bac-F.

Les anticorps 20 (anti-G) et AK13A2 (anti-F) ont servi de témoins. Ces anticorps (purifiés par immunoaffinité) ont été utilisés à des concentrations semblables à celles que l'on trouve dans les surnageants de culture des hybridomes (3 à 10 µg/ml).

Un critère de réactivité a été arbitrairement établi: ne sont considérés comme positifs que les surnageants ayant une D.O. supérieure à 0,200. Cette valeur correspond au double de la moyenne des 100 valeurs les plus faibles observées pour chaque antigène testé.

	Bac-G	Bac-F	RB94
3	+	-	+
23	-	-	+
16	+	-	-
18	+	+	+
4	+	+	-
4	-	+	-

68

Témoins			
20	+	-	+
AK13A2	-	+	+

Tableau VI: Résultats de la première sélection en ELISA indirect des hybridomes lors de la première fusion. Le tableau résume la réactivité des anticorps sécrétés par ceux-ci sur plusieurs antigènes. La positivité indiquée a été établie en fonction d'un seuil fixé à une D.O. de 0.200.

4.2. Résultats

Le tableau VI résume les résultats obtenus lors de cette étude.

La réactivité des anticorps témoins répond par ailleurs à ce critère de positivité en fonction de leur spécificité, à savoir que l'anticorps AK13A2 réagit sur le RB94 et le Bac-F, tandis que le 20 reconnaît le RB94 et le Bac-G. Par ailleurs, ces anticorps ne détectent pas le baculovirus n'exprimant pas sa protéine-cible.

Sur tous les puits testés, 68 ont été retenus en fonction de leur positivité sur au moins un des antigènes

Tout d'abord 3 hybridomes reconnaissent à la fois avec la protéine G exprimée en baculovirus et le virus entier RB94. Pareille réactivité suggère une spécificité pour la protéine G de la part des anticorps produits.

39 hybridomes (23+16) réagissent avec l'un ou l'autre de ces deux antigènes. A ce niveau, il est déjà plus difficile de déterminer la cible précise de ces anticorps. Tout d'abord, ces tests ont été réalisés avec des antigènes différents (au niveau de la quantité de protéines, de leur pureté, de la présentation des épitopes,...) et présentent donc des sensibilités différentes. Outre ce problème de sensibilité, un facteur antigénique peut intervenir. En effet, la souris a été immunisée avec de la protéine G purifiée de RB94 mais le rappel s'est effectué avec de la protéine G de NMK7 exprimée en baculovirus. Même si ces deux protéines sont fort semblables d'un point de vue moléculaire et antigénique, il peut exister toutefois quelques différences. Ainsi, le fait que ces anticorps réagissent contre un de ces deux antigènes peut traduire une spécificité pour un épitope de G non conservé entre les deux souches. De plus, en fonction du mode d'expression de la protéine G (dans les cellules Vero ou sf9) quelques différences dans sa maturation (notamment au niveau de la glycosylation) pourraient être responsables de la modification de certains épitopes.

L'analyse des résultats montre également que 18 hybridomes réagissent avec les trois antigènes utilisés. Cette polyréactivité peut avoir diverses origines. Tout d'abord, il est possible qu'on soit en présence d'anticorps réagissant contre des antigènes cellulaires communs aux trois préparations (cellules Vero pour le RB94, cellules sf9 pour le baculovirus). Dans ce cas, bien que son efficacité ait été prouvée à de nombreuses reprises, la technique de purification de la protéine

G ayant servi à l'immunisation pourrait-être mise en cause. Une co-purification de résidus cellulaires en même temps que la protéine G n'est pas à exclure. Rappelons aussi que la stimulation finale a été réalisée à l'aide d'une préparation de cellules infectées avec du Bac-G.

Outre ce problème de reconnaissance non-spécifique de la protéine G, une autre explication à cette polyréactivité peut venir du fait que ces hybridomes ne soient pas encore clonés. Dès lors, la présence de plusieurs hybridomes et donc d'anticorps à spécificité différente (anti-G ou anti-F) dans le surnageant pourrait être envisagée. On peut s'interroger à ce moment de la présence d'anticorps dirigés contre le Bac-F. A nouveau il faut aller chercher la réponse dans le processus de purification de la protéine G. Du fait de l'association en membrane de ces deux protéines, il est en effet tout à fait possible que la protéine F soit co-purifiée avec la G. Son caractère fortement immunogène fait que la protéine F, même présente en faible quantité, est capable d'induire l'émergence de lymphocytes spécifiques.

Sur ce tableau, on remarque également la présence de 4 hybridomes producteurs d'anticorps réagissant contre le Bac-G et le Bac-F, mais pas contre le RB94. A nouveau, le phénomène de polyréactivité n'est pas à exclure, mais ces résultats peuvent être également expliqués par une réactivité des anticorps vis à vis d'antigènes présents sur le baculovirus ou spécifiques des cellules sf9, hôte de la réplication du baculovirus.

A noter enfin la sélection de 4 hybridomes sécréteurs d'anticorps dirigés uniquement contre le Bac-F. L'absence de réactivité sur le Bac-G pourrait suggérer que ces anticorps soient spécifiques de la protéine F. Une différence de sensibilité entre le RB94 et les préparations en baculovirus pourrait également expliquer le manque de réactivité à l'encontre du virus entier (taux d'expression de la protéine F supérieur à celui sur le virus RB94).

Des anticorps spécifiques de la protéine F n'étant pas à négliger, nous avons décidé de conserver ces 4 hybridomes.

Même si certaines zones d'ombres subsistent en matière de spécificité des anticorps, cette démarche avait pour but principal d'opérer une première sélection des hybridomes à priori intéressants. Celle-ci a donc permis de réduire considérablement le panel d'hybridomes en éliminant les cellules non productrices dont le maintien en culture serait inutile.

Les hybridomes sélectionnés après cette première sélection ont ensuite été transférés en macropuits (en milieu non-sélectif), de manière à favoriser au mieux leur croissance ainsi que la production d'anticorps. Une dizaine de jours après ce transfert, une seconde sélection est réalisée.

	RB94	NMK7	Cellules VERO
3H4	+	+	-
4B12	+	+	-
7H12	+	-	-
9G10	+	+	-
5D10	+/-	-	-

Témoins			
20	+	+	-
AK13A2	+	+	-

Tableau VII: Résultats de la seconde sélection des hybridomes sur monocouches de cellules infectées. La positivité indique la détection d'effets cytopathogènes dûs au RSV.

4.3. Seconde sélection des hybridomes

Cette seconde sélection permet de vérifier si la production d'anticorps par les hybridomes est toujours efficiente. Il arrive en effet assez fréquemment que ces hybridomes ne parviennent pas à stabiliser leur croissance ou voient leur rendement altéré lors d'une mise en culture à plus grande échelle.

Elle s'est opérée selon deux modalités. La première consiste à tester les surnageants de culture sur des monocouches de cellules infectées par différentes souches de BRSV, la seconde à évaluer la réactivité de ces mêmes surnageants sur différents antigènes en ELISA indirect.

4.3.1. Test des surnageants sur monocouches de cellules infectées

4.3.1.1. Procédé

Les différents surnageants ainsi que les témoins (identiques à ceux utilisés lors du test précédent) ont été déposés sur des cellules Vero préalablement infectée par les souches RB94 ou NMK7 ainsi que sur des cellules. La révélation du test a été effectuée en immunoperoxydase.

Dans le cas où ces anticorps reconnaissent des antigènes viraux, on pourra alors observer la présence d'effets cytopathogènes spécifiques du BRSV (syncytia) marqués.

Les anticorps témoins sont identiques à ceux mentionnés lors de la première sélection.

4.3.1.2. Résultats

On se rend compte dans un premier temps que les témoins réagissent de façon attendue, à savoir qu'ils identifient les effets cytopathogènes produits par les souches RB94 et NMK7 tout en étant négatifs sur les cellules non infectées (tableau VII).

Par contre, nous n'avons observé la présence de syncytia marqués que pour 5 des surnageants d'hybridomes. Ainsi le 3H4, le 4B12 et le 9G10 mettent en évidence les effets cytopathogènes sur les cellules infectées aussi bien par le RB94 que sur celles infectées par NMK7. Le 7H12 et

	RB94	Bac-G	Bac-F	NC2
3H4	+	-	+/-	-
5D10	+	-	-	-
7H12	+/-	-	-	-
9G10	+/-	+/-	+/-	+/-
Témoins				
AK13A2	+	-	+	-
20	+	+	-	-

Tableau VIII: Résultats de la seconde sélection (en ELISA indirect) de la première fusion. La positivité indique une valeur de D.O. supérieure à 0.200. Le signe +/- correspond à une D.O. plus grande que le seuil de positivité choisi mais inférieur à 0.300.

le 5D10 (pour lequel l'intensité du marquage est plus faible), ne sont positifs par contre que sur le RB94. Ces 5 surnageants sont également négatifs sur les cellules non-infectées.

4.4. Test des surnageants en ELISA indirect

4.4.1. Procédé

Le test a été réalisé sur les mêmes antigènes que lors de la première sélection, à savoir le RB94, le Bac-G et le Bac-F. Toutefois, suspectant une réactivité de certains anticorps contre les constituants du baculovirus ou contre certains antigènes d'origine cellulaire, un quatrième antigène a été ajouté comme témoin négatif. Il s'agit du Bac-wt, vecteur baculovirus n'exprimant pas de protéines recombinantes et cultivé également sur des cellules sf9.

Les témoins utilisés sont identiques et à même concentration que lors du test précédent.

Le critère de réactivité est semblable à celui utilisé lors de la première sélection (D.O. supérieure à 0.200).

4.4.2. Résultats:

Sur les 68 surnageants testés, beaucoup réagissent sur le Bac-wt (traduisant une réactivité non-spécifique des protéines du RSV) ou alors sur aucun des antigènes utilisés, signe d'une production d'anticorps absente ou trop restreinte que pour être décelée lors de ce test.

Cependant, 4 surnageants d'hybridomes ont été sélectionnés sur base d'une réactivité assez intéressante. Il s'agit des hybridomes 3H4, 5D10, 7H12 et 9G10 (tableau VIII).

Les anticorps du surnageant 3H4 reconnaissent le virus RB94 entier ainsi que le Bac-F.

Les anticorps 5D10 et 7H12 reconnaissent uniquement le virus RB94 entier.

L'anticorp 9G10 reconnaît les 4 types d'antigènes.

Néanmoins, il nous faut souligner qu'à l'exception des anticorps 3H4 et 5D10 sur le RB94, les réactivités observées restent très faibles (légèrement supérieures au seuil mais inférieure à une D.O. de 0,300).

Sur base des résultats de ces deux tests, convergents pour la plupart, les hybridomes 3H4, 4B12, 5D10, 7H12 et 9G10 ont été conservés. Ils sont en effet tous les cinq susceptibles de sécréter un

ou plusieurs anticorps à priori intéressants. Ainsi, le 3H4 montre une spécificité pour la protéine F, tant sur la souche RB94 que sur la souche NMK7. Sur les deux tests réalisés, le 5D10 et le 7H12 n'ont réagi qu'avec le RB94, mais aucune spécificité particulière pour une protéine n'a pu être démontrée pour ces deux anticorps. Le 4B12 reconnaît les souches RB94 et NMK7, mais aucun des antigènes présentés lors du test ELISA. Les résultats de ce test suggèrent également que le 9G10 reconnaisse un antigène cellulaire. Toutefois, la présence de plusieurs hybridomes dans ce puits est bien possible, cette idée étant renforcée par la réactivité du surnageant sur les deux souches virales en culture et pas sur les cellules non-infectées (tableau VII).

4.5. Clonage des hybridomes

Comme il a été rappelé ci-dessus, chacun des puits est susceptible de contenir un ou plusieurs hybridomes différents. Dès lors, le surnageant peut également contenir plusieurs anticorps à réactivité différente.

Une caractérisation plus approfondie ne peut se faire qu'à partir du moment où le surnageant ne contient plus que des anticorps originaires d'un seul clone producteur. –

Dès lors, l'étape suivante de la démarche consiste à cloner les différents hybridomes obtenus, par la technique de la dilution-limite.

4.5.1. Clonage proprement dit

Cette étape très délicate peut ne pas être supportée par certains hybridomes. Ainsi, un suivi microscopique des différents clones a permis de se rendre compte de l'incapacité qu'a le 7H12 à se développer en culture une fois cloné. Différentes tentatives successives ayant échoué, il a fallu se résoudre à abandonner cet hybridome.

4.5.2. Test de la réactivité des différents clones

Une fois clonés, la réactivité des surnageants des quatre autres hybridomes a été étudiée au moyen d'un ELISA indirect, de manière à vérifier l'efficacité de leur production d'anticorps.

Les antigènes utilisés au cours de ce test sont: le virus entier RB94, le Bac-G, le Bac-F et le Bac-wt (comme témoin négatif). Les anticorps 20 et AK13A2 ont été utilisés comme témoins.

Ont été testés, le surnageant de chacun des clones ainsi que celui des hybridomes ayant servi au clonage.

Seuls l'hybridome 3H4 et ses clones ont montré une réactivité comparable à celle obtenue lors du test précédent, à savoir qu'ils sont positifs sur le RB94 et le Bac-F mais négatif sur le Bac-G et NC2. Les autres hybridomes et leurs clones respectifs se sont révélés être négatifs sur tous les antigènes testés.

Un des clones du 3H4 a été choisi en vue de continuer la caractérisation.

Plusieurs tentatives de clonages effectuées pour les hybridomes 4B12, 5D10 et 9G10 à partir de cellules précédemment congelées se sont révélées infructueuses. Les problèmes se situaient soit au niveau de la productivité des hybridomes, soit au niveau de la croissance ou de la productivité des clones.

Au terme de cette fusion, il nous reste donc un hybridome producteur d'anticorps monoclonal dirigé contre la protéine F: le 3H4F6.

Au vu de ces résultats, nous avons effectué une seconde fusion.

5. Seconde fusion

Pour cette seconde fusion, nous avons décidé de procéder aux rappels de la souris avec de la protéine G purifiée à partir d'un lysat de culture du virus RB94.

Ainsi, 35 µg de protéine G ont été injectés à la souris, par voies intraveineuse et intrapéritonéale, trois jours avant la récupération de la rate.

Cette fusion a reçu le nom de CM. Elle a été réalisée dans les mêmes conditions que la première, les cellules ayant été réparties dans 9 plaques multipuits.

	RB94	Gpurifiée	F purifiée	Bac-G	Bac-wt
8	+	+	-	+	-
5	+	+	-	-	-
9	-	+	-	+	-
3	+	-	-	+	-
1	+	-	-	-	-

26

Tableau IX: Résultats de la première sélection (en ELISA indirect) des hybridomes de la seconde fusion. Le tableau résume la réactivité des anticorps sécrétés par ceux-ci sur plusieurs antigènes. La positivité indiquée a été établie en fonction d'un seuil fixé à une D.O. de 0.120.

5.1. Première sélection des hybridomes

A nouveau, la sélection des hybridomes s'est faite au moyen de tests antigéniques.

5.1.1. Modalités des tests antigéniques

Le premier criblage des anticorps a été réalisé, en Elisa-indirect, sur différents antigènes, à savoir: le virus entier RB94, les protéines F et G purifiées, le Bac-G et le Bac-wt.

Les témoins utilisés sont le 20 et l'AK13A2.

5.1.2. Résultats

Le test des surnageants sur autant d'antigènes génère un profil de réactivité assez varié. Dès lors, la sélection s'est opérée sur base de critères stricts. Ainsi, n'ont été sélectionnés que les surnageants étant positifs sur au moins deux des trois formes présentes de la protéine G (RB94, Bac-G et G purifiée) tout en montrant une absence de réactivité sur la protéine F et le Bac-wt. Le seuil critique de positivité a été arbitrairement fixé à une D.O. de 0,120 en fonction du double de la moyenne des 100 valeurs de D.O. les plus faibles observées lors de ce test.

Le tableau IX rend bien compte du fait que les anticorps témoins 20 et AK13A2 réagissent uniquement sur les différentes formes de protéine G et F respectivement, présentes dans ces différentes préparations.

Comme l'indique ce tableau, 8 surnageants réagissent avec les trois antigènes contenant la protéine G. Suite à l'absence de réactivité sur la protéine F et sur le Bac-wt, il est difficilement envisageable que les anticorps contenus dans ces surnageants puissent réagir sur des antigènes cellulaires. Ces considérations désignent dès lors la protéine G comme étant la cible la plus probable de ces anticorps. De plus, vu que ces antigènes sont issus de préparations différentes, il est probable que les anticorps reconnaissent des épitopes conservés entre les souches RB94 et NMK7 sur la protéine G.

Des raisonnements analogues à ceux évoqués lors de la première fusion peuvent être avancés pour expliquer les différentes réactivités observées pour les autres surnageants. Néanmoins, à la

lueur des résultats obtenus précédemment, il nous semble préférable de confirmer leur réactivité avant de nous avancer à quelque supposition quant à la spécificité de ces anticorps.

Un dernier hybridome s'éloignant toutefois des critères établis a été sélectionné. Il n'est en effet positif que sur RB94, mais la réactivité qu'il montre à l'égard de cet antigène est assez élevée (D.O. de 1,069, le témoin positif 20 faisant 1,352).

Sur base de ce test, 26 hybridomes ont ainsi été retenus.

5.2. Seconde sélection des hybridomes

Après dix jours de culture en macropuits, un premier examen microscopique révèle que sur les 26 puits de départ, il y en a 11 pour lesquels le développement des cellules ne s'est pas réalisé. La vérification de la production d'anticorps par les hybridomes présents dans les 15 puits restants a été réalisée sur base de leur réactivité sur monocouches de cellules infectées ainsi qu'en dot-blot sur les protéines F et G purifiées.

5.2.1. Test des surnageants sur monocouches de cellules infectées

Les surnageants ont été testés en immunoperoxydase sur une plaque de cellules Vero infectées par la souche RB94 et sur une plaque de cellules Vero non infectées en guise de témoin négatif. Les témoins utilisés au cours de ce test sont les mêmes que précédemment.

5.2.1.1. Résultats

La réactivité des témoins est celle attendue.

Il apparaît que seuls 2 surnageants sur les 15 testés réagissent contre la souche RB94 tout en étant négatifs sur les cellules non-infectées. Il s'agit des hybridomes 1D1 et 3A11. Le fait que ces anticorps soient positifs sur RB94 et négatifs sur les cellules Vero montre bien qu'ils ne réagissent pas avec des antigènes d'origine cellulaire, mais bien avec des antigènes du RB94.

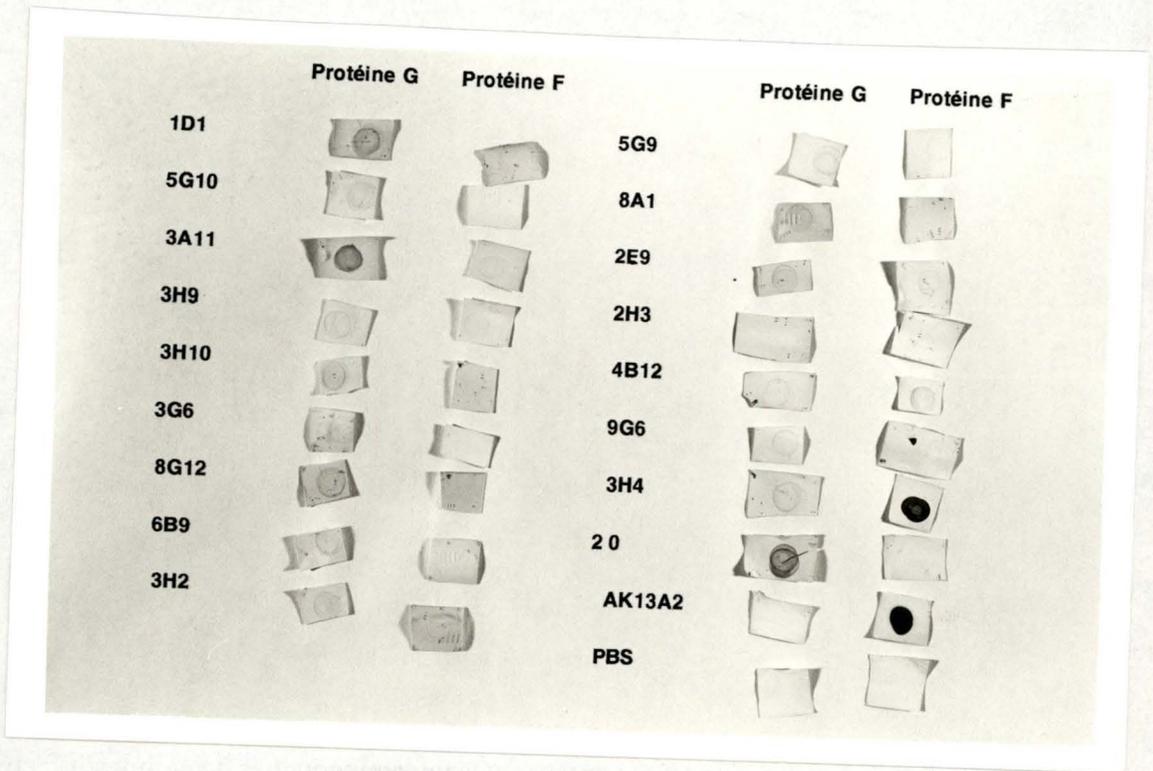


Figure 13: Test de dot-blot réalisés sur les protéines F et G purifiées a l'aide des anticorps issus de la deuxième fusion

Les 13 autres surnageants se sont révélés négatifs sur tous les antigènes présentés, suggérant une production d'anticorps par les différents hybridomes trop faible que pour pouvoir être décelée.

5.2.2. Test des surnageants en dot-blot.

5.2.2.1. Principe du test

Les 15 surnageants d'hybridomes ainsi que les anticorps produits par le clone 3H4F6 issu de la première fusion ont été déposés sur les protéines F et G purifiées préalablement adsorbées sur une membrane de nitrocellulose. La fixation des anticorps sur ces antigènes est ensuite révélée en immunoperoxydase. Les témoins utilisés sont identiques à ceux des test précédants.

5.2.2.2. Résultats

la figure 13 indique clairement que le profil de réactivité du 3H4 ainsi que des anticorps témoins 20 et AK13A2 est celui attendu. Le 3H4 et l'AK13A2 marque en effet uniquement la protéine F purifiée, au contraire de l'anticorps 20 qui lui ne réagit que sur la protéine G.

Ces résultats confirment que sur les 15 surnageants testés, seuls le 1D1 et le 3A11 montrent une réactivité pour le BRSV. En outre, ce test nous apprend que ces anticorps sont spécifiques de la protéine G, aucune réactivité n'étant associée à la protéine F. A noter qu'il y a bien quelques anticorps montrant un marquage sur une des deux protéines, mais celui-ci est beaucoup trop faible que pour pouvoir être pris sérieusement en considération.

La possibilité de la présence dans les puits de plusieurs hybridomes de spécificité différente n'étant pas à exclure, les hybridomes 1D1 et le 3A11 ont été clonés.

5.3. Clonage du 1D1 et du 3A11

Celui-ci s'est à nouveau réalisé via la technique de dilution-limite. La réactivité des clones a ensuite été testée en ELISA indirect sur le virus entier RB94.

La réactivité des témoins est celle attendue, mais il apparaît que seul le 3A11 produit encore des anticorps capable de réagir contre cet antigène.

Plusieurs autres clonages du 1D1 ont été effectués à partir d'hybridomes préalablement congelés, sans pour autant apporter plus de résultats.

Il fallut dès lors abandonner cet hybridome et ne plus tenir compte pour cette fusion que du 3A11.

Au terme de ces deux fusions, nous avons obtenu un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine F (le 3H4) et un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine G (le 3A11). Disposant également au laboratoire d'un anticorps anti-F (le 2D6) issu d'une fusion réalisée précédemment et n'ayant jamais été caractérisé plus précisément, nous avons décidé d'intégrer également cet anticorps pour la deuxième partie du travail. L'origine de cet anticorps est brièvement expliquée ci-dessous

6. Origine du 2D6

L' anticorps 2D6 est issu de la fusion CG réalisée précédemment au sein de notre laboratoire, à partir d'une souris immunisée avec la protéine F du virus RB94 exprimée en baculovirus (Bac-F).

Les différents tests de sélection réalisés au cours de cette fusion montre une réactivité du surnageant de cet hybridome en ELISA indirect sur le virus entier RB94, sur le Bac-F mais pas sur le Bac-wt, révélant ainsi sa spécificité pour la protéine F. Les produits du clonage ayant gardé le même profil, le 2D6 fut assigné à la protéine F du BRSV (K.Walravens, résultats non publiés).

Le travail de production étant à présent terminé, nos trois anticorps monoclonaux ont été caractérisés plus amplement.

CHAPITRE II. PREPARATION DES ANTICORPS POUR LEUR CARCTERISATION

Une caractérisation approfondie requiert une quantité non négligeable d'anticorps monoclonaux. Les surnageants de culture n'en contenant généralement que quelques $\mu\text{g/ml}$, il faut donc se tourner vers une technique de production plus efficace. C'est dans cette optique que nous avons entamé la production *in vivo* d'anticorps monoclonaux.

1. Production *in vivo* d'anticorps monoclonaux

La technique utilisée consiste en l'injection des hybridomes dans la cavité péritonéale de souris. Après quelques jours de culture *in vivo*, le liquide péritonéal (ascite) généré par le développement des hybridomes est récupéré. Il contient au moins 1 mg/ml d'anticorps produits et sécrétés par ces derniers.

Bien qu'ils soient riches en anticorps, ces liquides ne sont pour autant pas dépourvus de graisse, cellules, protéines et autres composants issus de la cavité péritonéale de la souris.

La purification des anticorps monoclonaux se réalise par chromatographie d'affinité sur une colonne généralement couplée à une protéine bactérienne (A ou G), cette dernière ayant une affinité toute particulière pour les parties constantes des chaînes lourdes des anticorps (fragments Fc). Néanmoins, le type de protéine utilisée est tributaire de l'isotypie de ces anticorps. Il nous faut dès lors la déterminer pour nos trois monoclonaux.

2. Test d'isotypie de nos anticorps

2.1. Principe du test

L'isotypie d'un anticorps est déterminée par le type de chaînes lourdes qu'il possède. On fait ainsi la différenciation, chez la souris, entre les IgA, les IgD, les IgE, les IgG et les IgM. Il existe cependant des sous-classes au sein des IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b et IgG3), qu'il convient de distinguer.

Disposant d'anticorps dirigés chaque fois contre une sous-classe bien précise, ce test consiste à observer leur réactivité sur nos trois anticorps monoclonaux.

2.2. Résultats

A l'issue de ce test, il apparaît que nos anticorps monoclonaux ont chacun un isotype spécifique, à savoir que le 2D6 est un IgG1, le 3H4 un IgG2a et le 3A11 un IgG2b.

Connaissant à présent l'isotypie de nos anticorps, on peut commencer la purification des liquides d'ascites.

3. Purification des liquides d'ascites

Sachant que tous nos anticorps sont des IgG, les ascites ont été purifiées sur une colonne de protéine A de *Staphylococcus aureus*.

Disposant dès lors d'anticorps purifiés en plus de ceux présents dans les surnageants de culture, nous pouvons dès à présent commencer le travail de caractérisation de ces monoclonaux.

CHAPITRE III. CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

La caractérisation de nos trois anticorps monoclonaux s'est opérée selon deux modalités. La caractérisation fonctionnelle a permis d'évaluer leur capacité à inhiber le pouvoir infectieux du virus lors de tests réalisés *in vitro* tandis que la caractérisation antigénique a eu pour but l'identification des régions protéiques reconnues par ces anticorps sur les protéines F ou G.

1. Caractérisation fonctionnelle des anticorps monoclonaux

L'activité fonctionnelle de nos anticorps à l'encontre du virus a été déterminée au moyen d'un test de séroneutralisation. Celui-ci permet d'évaluer la capacité qu'ont les anticorps à empêcher l'infection de cellules par le virus.

1.1. Principe du test de séroneutralisation

La première étape du test consiste à incuber diverses dilutions de chacun des trois anticorps purifiés avec le virus RB94. Le mélange résultant est ensuite déposé sur une monocouche de cellules Vero afin d'évaluer le pouvoir infectieux du virus en présence des anticorps monoclonaux. Le témoin positif utilisé est l'AK13A2, alors que les anticorps 7C7 (anti-classe II bovin) a servi de témoin négatif. Chaque test est réalisé en double exemplaire.

Les cellules sont fixées après trois jours de culture et les effets cytopathogènes (syncytia) sont révélés en immunoperoxydase au moyen de l'anticorps monoclonal AK13A2.

1.2. Résultats

Le titre neutralisant (exprimé en ng/ml) a été établi comme étant la dilution la plus faible d'un anticorps monoclonal pour laquelle on observe une réduction de 50 % d'effets cytopathogènes par rapport à un témoin viral n'ayant pas été incubé en présence d'anticorps.

Suivant le critère établi, on observe bien une neutralisation de la part de l'anticorps AK13A2 (titre de 2 ng/ml) mais pas pour les anticorps 7C7 et 8C11.

De plus, aucune activité neutralisante n'a pu être associée à nos anticorps monoclonaux lors de ce test.

2. Caractérisation antigénique des anticorps monoclonaux

La caractérisation antigénique de nos anticorps s'est réalisée en plusieurs étapes. Dans un premier temps, leur réactivité a été analysée sur différentes souches de BRSV puis sur les protéines F et G dénaturées, de manière à étudier respectivement la variabilité et la structure des

	NMK7 (A)	RB94 (A/B)	Bov X (B)	WBH (atypique)	A2 (Humaine)	Cellules VERO
3H4	+	+	+	+	+	-
2D6	+	+	+	+	-	-
3A11	+	+	-	-	-	-

Témoins						
AK13A2	+	+	+	+	+	-
20	+	+	-	-	-	-

Tableau X : Tests de la réactivité des anticorps sur des cellules VERO infectées par différentes souches virales

épitopes reconnus. Les tests de compétitions ont ensuite été abordés afin d'établir des correspondances avec des sites antigéniques déjà décrits.

2.1. Tests des anticorps monoclonaux sur différentes souches virales

Ce test a pour objectif d'évaluer la conservation des épitopes reconnus par nos anticorps monoclonaux. A ce titre, la réactivité de ceux-ci sur un panel de souches bovines renseigne sur la conservation des épitopes au sein du BRSV. De plus, l'incorporation d'une souche humaine dans cette étude permet d'élargir nos conclusions au HRSV.

2.1.1. Mise en oeuvre du test

Nos trois anticorps ont été testés sur les souches prototypes RB94 (A/B), NMK7 (A), Bov-X (B), WBH (souche atypique) et la souche humaine A2 préalablement mises en culture sur cellules Vero. De plus, chacun de ces anticorps a été déposé sur des cellules Vero non infectées, de manière à avoir un témoin antigénique négatif. Ce test, révélé à l'immunoperoxydase, a été réalisé avec les anticorps en surnageant de culture et les anticorps purifiés à partir de liquide d'ascite.

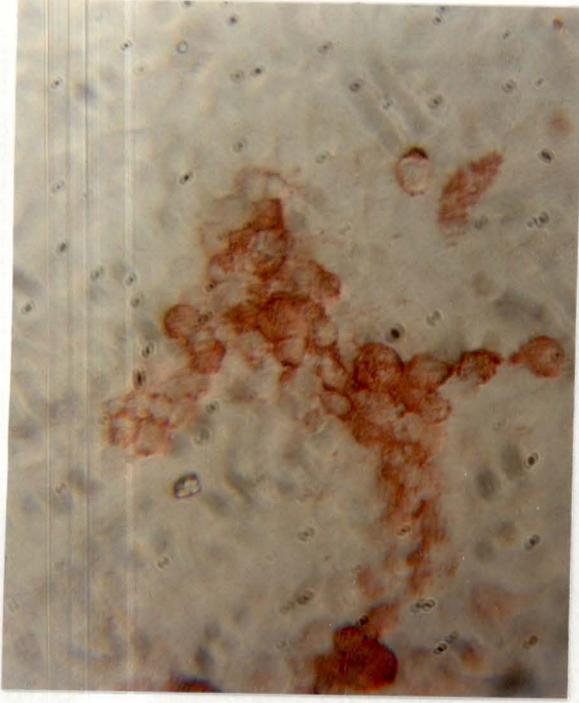
Le premier témoin positif utilisé est l'anticorps AK13A2 (anti-F), réagissant avec l'ensemble des souches utilisées. Ne disposant pas d'anticorps capable de reconnaître individuellement chacune des souches, nous nous sommes dès lors tournés vers l'utilisation de l'anticorps 20 (anti-G), présentant un profil de réactivité intermédiaire. Il réagit en effet uniquement sur les souches de types A et A/B (Furze *et al.*, 1993) (Prozzi *et al.*, in press).

La réactivité des anticorps est jugée par la présence ou l'absence d'effets cytopathogènes marqués.

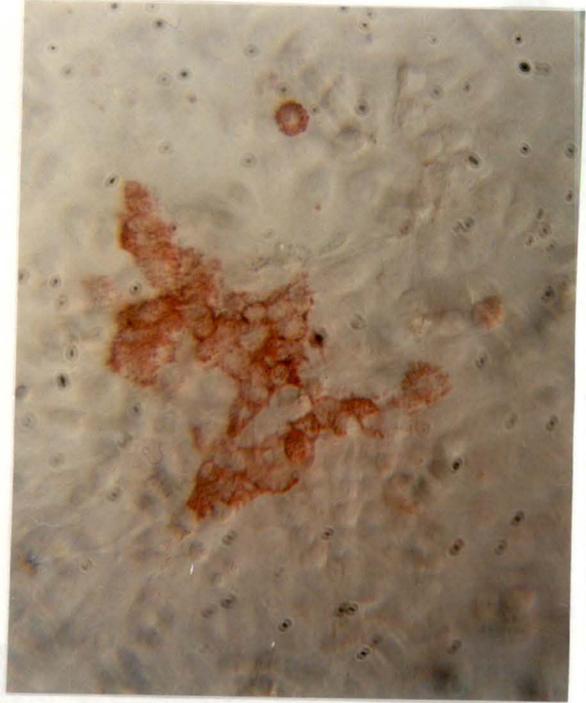
2.1.2. Résultats

Les résultats, présentés dans le tableau X, laissent tout d'abord apparaître qu'aucun des anticorps testés ne réagit avec les cellules Vero non infectées.

3H4



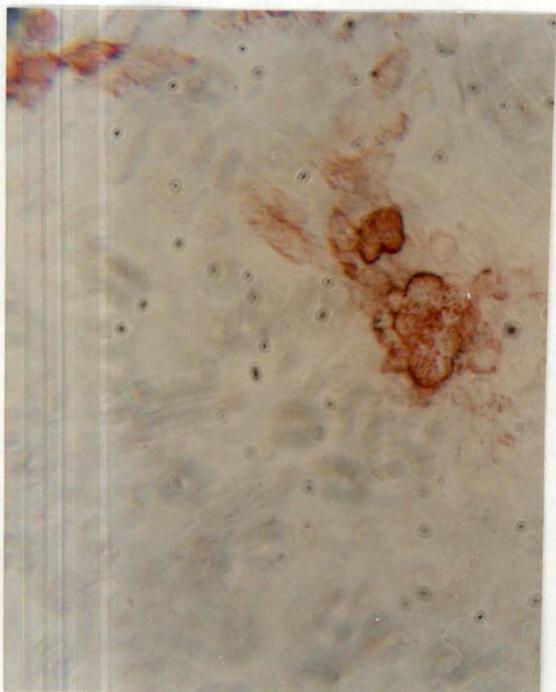
RB94



A2



2D6

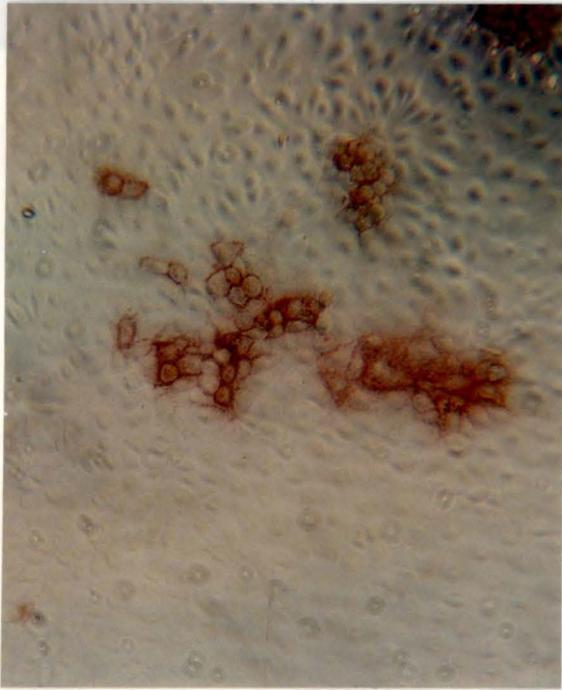


RB94



A2

3A11



RB94



Bov-X

Figure 14: Photographies (Grossissement =200 x) montrant le marquage par nos anticorps des effets cytopathogènes dûs à l'infection de cellules Vero par différentes souches virales

On remarque que nos anticorps monoclonaux ont tous les trois un profil de réactivité différent sur ces souches.

L'anticorps 3H4 est capable de reconnaître, comme l'AK13A2, toutes les souches testées, tant humaine que bovines.

L'anticorps 2D6 réagit avec toutes les souches bovines testées, mais pas avec la souche humaine A2.

Le 3A11 ne reconnaît que les souches RB94 et NMK7, possédant ainsi un profil de réactivité comparable à celui observé pour l'anticorps témoin 20.

Les résultats obtenus sont les mêmes en utilisant les anticorps purifiés ou en surnageant de culture.

La figure 14 donne un exemple de la réactivité observée pour chacun de nos monoclonaux sur certaines souches virales.

2.2. Western blotting

Alors que le test sur les souches met en évidence le caractère conservé ou non des épitopes reconnus par les anticorps testés, le Western blotting permet surtout de savoir si la conformation des épitopes est importante pour la reconnaissance des anticorps.

Il consiste en effet à évaluer la réactivité de ces anticorps sur des protéines et de plus, préalablement séparées par électrophorèse et transférées sur une membrane de nitrocellulose.

Le mode de préparation de l'antigène testé ainsi que les conditions d'électrophorèse utilisées induisent généralement une dénaturation notable des protéines de l'échantillon.

2.2.1. Mise en oeuvre du test

Nos trois anticorps monoclonaux ainsi que les anticorps témoins AK13A2 (anti-F) et 20 (anti-G) ont été déposés sur différents antigènes (RB94, F et G purifiées, F et G en baculovirus et Bac-wt) préalablement transférés sur une membrane de nitrocellulose.

La révélation des protéines marquées par ces anticorps se fait en immunoperoxydase.

La migration des étalons de Masse Moléculaire (MM) connue et leur révélation à l'Amido-Black permet d'évaluer la taille des protéines détectées au cours de ce test.

2.2.2. Résultats

Les anticorps AK13A2 et 20 identifient des antigènes aux MM attendues pour les protéines F et G (respectivement 70 kDa pour F et 80-90 kDa pour G).

Par contre, les différents tests réalisés n'ont pas permis de mettre en évidence le marquage de la protéine F par les anticorps 3H4 et 2D6 ni celui de la protéine G par l'anticorps 3A11 et ce, malgré la mise en jeu de concentration en anticorps allant jusqu'à 15 µg/ml.

Malgré le fait que nos anticorps 3H4 et 3A11 possèdent le même profil de réactivité sur les souches que les anticorps AK13A2 et 20 respectivement, ce test montre que ces anticorps reconnaissent des épitopes de structure différente. Il est donc intéressant d'aller plus loin dans leur caractérisation afin de localiser ces épitopes

2.3. Titrage de nos anticorps monoclonaux

Une manière de poursuivre cette caractérisation consiste à établir une courbe de titrage de chacun de ces anticorps. Cette étape permet aussi de s'assurer que, lors des différents tests réalisés, l'absence de réactivité d'un anticorps sur un antigène n'est pas lié à un problème au niveau de la force de la liaison entre l'anticorps et l'antigène, mais bien dû au fait que l'épitope reconnu par cet anticorps n'est pas présent.

Une évaluation de la force de liaison de nos différents anticorps monoclonaux a été réalisée en déterminant l'avidité relative de nos anticorps pour le virus. L'utilisation du terme avidité plutôt que de celui d'affinité permet de tenir compte dans cette notion de différents paramètres difficilement contrôlables lors de ce genre de test (quantités d'antigènes, multivalence des anticorps et/ou des antigènes,...). Le terme relatif lui sera également associé afin de montrer que ces mesures s'effectuent lors d'un test particulier et dans des conditions bien précises.

2.3.1. Mise en oeuvre du test

Le test concerné est un ELISA indirect utilisant comme antigène un lysat de culture de la souche RB94 du BRSV.

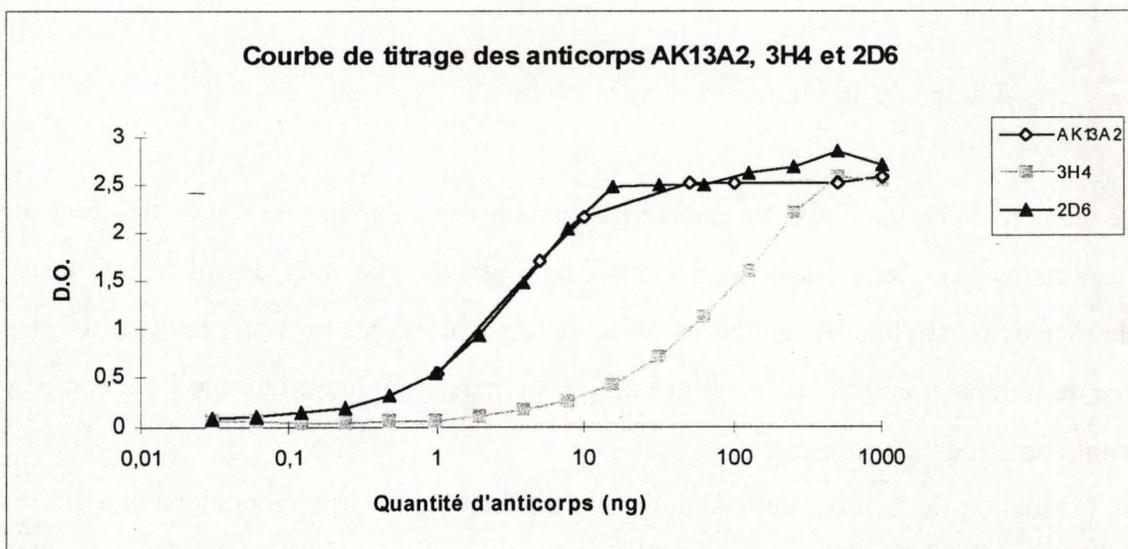
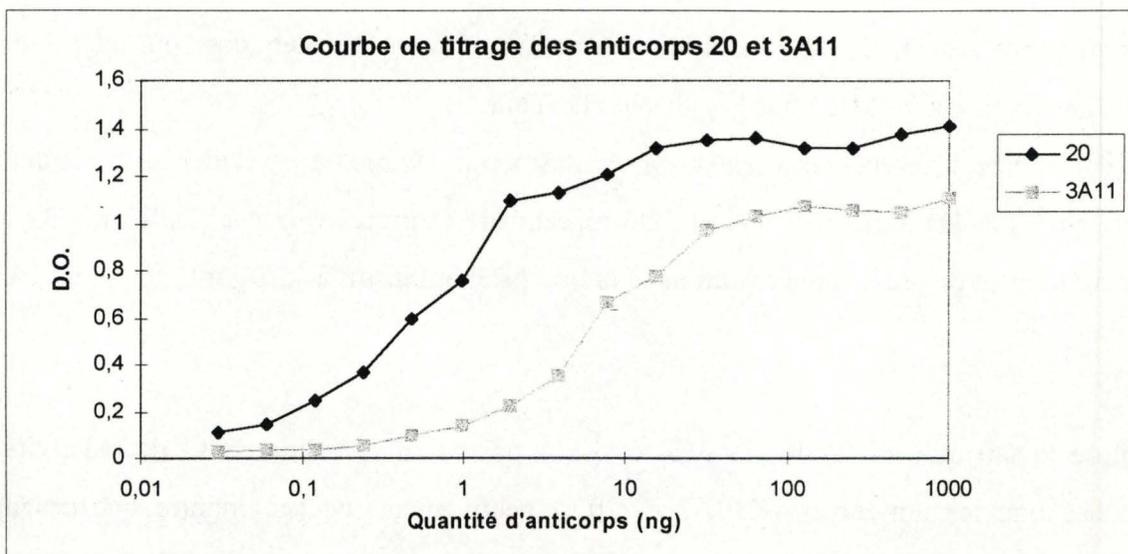


Figure 15: Courbes de titrage des anticorps monoclonaux 20, 3A11, AK13A2, 3H4 et 2D6. Elles expriment les DO obtenues pour des quantités croissantes d'anticorps testés en ELISA indirect sur du RB94.

Nos trois monoclonaux de même que les anticorps AK13A2 et 20 ont été déposés en dilution sur le virus RB94 entier, la concentration de départ pour chacun de ces anticorps étant de 1 µg/100 µl. Chaque test a été effectué en double exemplaire et révélé en immunoperoxydase.

La courbe de titrage a été établie sur base de la D.O. moyenne des duplicates pour chacune des concentrations testées.

2.3.2. Résultats

Parmi les nombreuses publications en la matière, divers critères arbitraires ont été mentionnés pour définir l'avidité relative d'un anticorps pour son antigène. Le critère utilisé lors de ce test, en accord avec ce qui est observé dans la littérature chez le BRSV (West *et al.*, 1994), sera la dilution donnant une D.O. correspondant à 50 % du maximum de la valeur observée à la D.O.-plateau sur ces courbes sigmoïdes.

La figure 15 fait état des courbes obtenues pour chacun des anticorps testés.

Il apparaît ainsi que l'anticorps 20 a une plus grande avidité relative pour l'antigène que le 3A11. En effet, en analysant la courbe, on se rend compte que l'anticorps 20 peut être utilisé jusqu'à une concentration de 1 ng/100 µl, au contraire de l'anticorps 3A11 pour lequel la concentration optimale est de 8 ng/ 100 µl.

De même, pour ce qui est des anticorps anti-F testés, on se rend compte que le 2D6 et l'AK13A2 possède des avidités relativement proches les une par rapport aux autres, en fonction de la précision accordée à ce test. On peut en effet l'utiliser jusqu'à une concentration proche de 5 ng/ 100 µl. Ces résultats suggèrent que notre anticorps 2D6 possède une avidité relative assez important, des analyses comparatives avec un panel d'anticorps monoclonaux anti-protéine F ayant en effet montré que celle-ci est très élevée chez l'AK13A2 (Matheise *et al.*, résultats non publiés).

Le 3H4 possède par contre une avidité relative plus faible que ces deux anticorps. Selon le critère établi, sa concentration optimale d'utilisation est de 80 ng/ 100 µl.

Au terme de cette étude, l'absence de réactivité de nos anticorps monoclonaux sur des antigènes particuliers ne peut donc s'expliquer par une faible affinité.

Nous pouvons dès à présent entamer les tests de compétition.

2.4. Tests de compétition

Le test de compétition consiste à évaluer la capacité qu'ont des anticorps monoclonaux à entrer en compétition pour un même épitope ou à des épitopes relativement proches sur la protéine. L'inhibition mutuelle de leur liaison à l'antigène permettra de classer les épitopes reconnus dans un même site antigénique.

Nos anticorps monoclonaux peuvent être ainsi testés les uns contre les autres. Néanmoins, étant donné leur nombre relativement peu élevé, il est préférable de faire appel également à un panel d'anticorps précédemment caractérisés au laboratoire par J-P. Matheise dans le cadre de sa thèse, fournis par le Dr J. Kramps du CVI (Central Veterinary Institute, Lelystad, ND) ou par le Dr Taylor (Institute for Animal Health, Compton, U.K.). De plus, l'épitope reconnu par certains de ces anticorps ayant été localisés plus précisément, cette étude constitue un premier pas vers la détermination de la région antigénique reconnue par nos anticorps monoclonaux.

En pratique, le test de compétition se réalise en déposant sur l'antigène deux anticorps monoclonaux, à savoir un anticorps non marqué pour lequel on va évaluer le degré de compétition vis-à-vis d'un anticorps marqué. Ce test nécessite donc au préalable le couplage de nos anticorps monoclonaux à la peroxydase et leur titrage de manière à établir une dilution optimale d'utilisation de ces anticorps marqués.

2.4.1. Couplage des anticorps à la peroxydase et titrage de ces anticorps

Nos anticorps monoclonaux 3H4, 2D6 et 3A11 ont été couplés à la peroxydase selon le protocole décrit dans Matériel et Méthode.

L'efficacité du couplage a été vérifiée pour chacun de ces anticorps en réalisant un test ELISA indirect utilisant un lysat de la souche RB94 comme antigène.

Pour ce faire, des dilutions graduelles d'anticorps couplés ont été testées. Chaque test est réalisé en double et une courbe de titrage est établie sur base de la moyenne des D.O. obtenues pour ces duplicatas à chacune des dilutions.

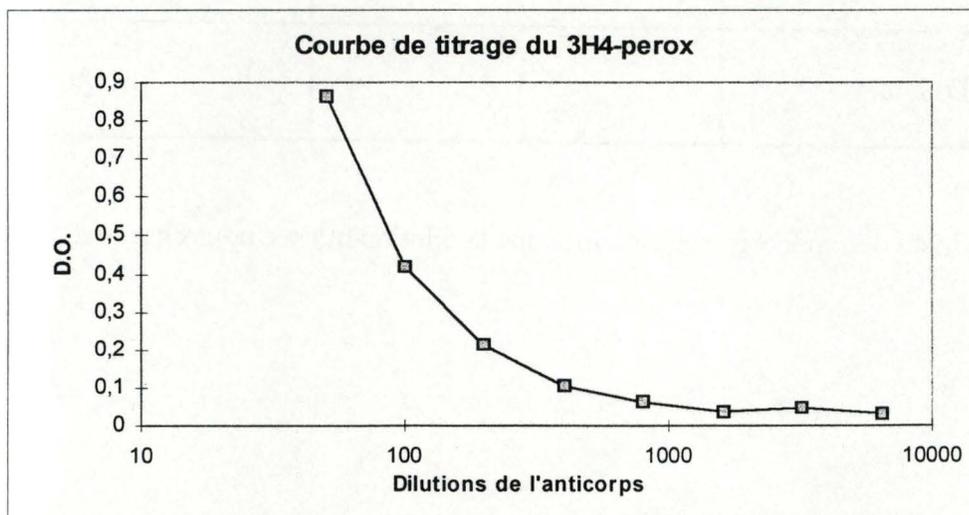
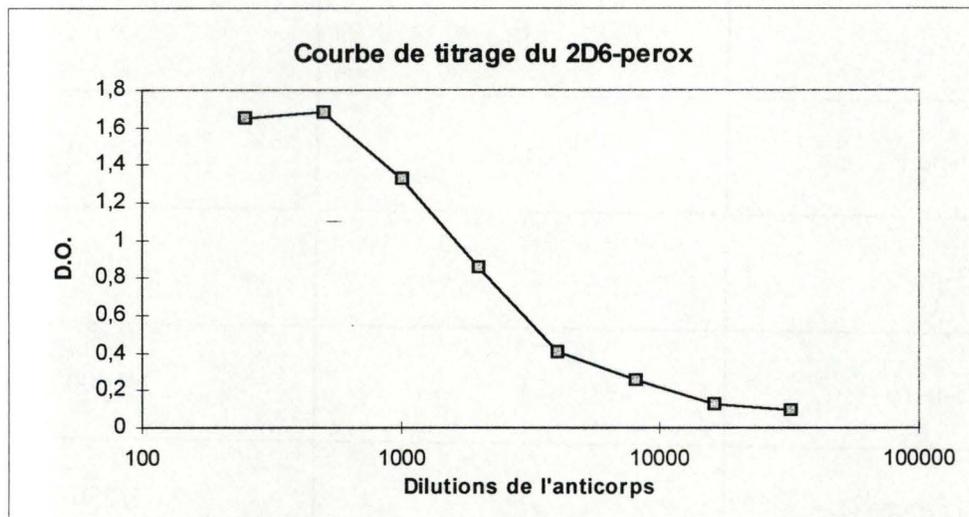
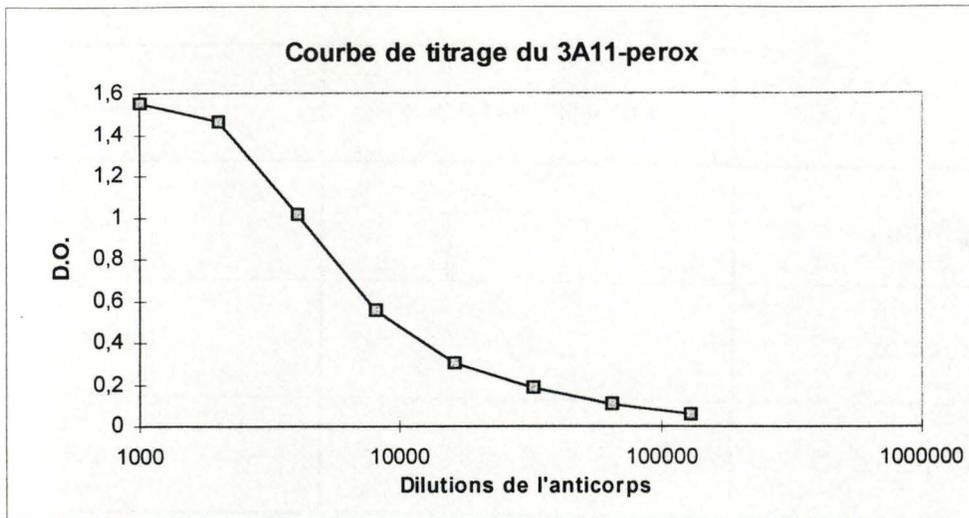


Figure 16: Courbes de titrage des anticorps monoclonaux 3A11, 2D6 et 3H4 couplés à la peroxydase. Elles expriment les DO obtenues pour des quantités croissantes d'anticorps testés en ELISA indirect sur du RB94.

	Protéines reconnues	Dilutions utilisées
3H4-perox	F	1/50
2D6-perox	F	1/1000
3A11-perox	G	1/4000
AK13A2-perox	F	1/2000
20-perox	G	1/8000
K3-perox	F	1/2000
K5-perox	F	1/1000
K115-perox	F	1/250
13D12-biot	F	1/100

Tableau XI: Liste des anticorps couplés ainsi que la dilution utilisée pour chacun d'eux

Ces courbes de titrage serviront aussi à définir la dilution optimale d'utilisation de ces anticorps lors des tests de compétition. Ils seront en effet utilisés à la dilution se rapprochant le plus de l'extrémité du plateau de D.O. observé. Ce seuil a été choisi en vue de favoriser la détection la plus sensible d'une perturbation de la fixation de l'anticorps couplés, signe d'un effet compétiteur entre les anticorps.

La figure 16 fait part de l'efficacité des couplages réalisés pour nos trois anticorps monoclonaux. L'analyse de ces courbes permet de se rendre compte que, selon les critères établis, l'anticorps 3H4-perox pourra être dilué 50 X, le 2D6-perox 1000 X et le 3A11-perox 4000 X lors des tests de compétition.

Pareilles courbes de titrage ont aussi été réalisées pour les différents anticorps couplés (à la peroxydase ou à la biotine) mis à notre disposition. Un de ces anticorps reconnaît la protéine G (20-perox) alors que les six autres sont spécifiques de la protéine F (K3-perox, K5-perox, K115-perox, AK13A2-perox, AL13D12-biot et AL11C2-biot).

Le tableau XI reprend la spécificité ainsi que les dilutions optimales de tous les anticorps couplés utilisés lors de ces tests.

2.4.2. Test de compétition proprement dit

2.4.2.1. Mise en oeuvre du test

Ce test ELISA consiste à analyser la réactivité (sur l'antigène RB94) d'un mélange des deux anticorps (l'un marqué et l'autre non marqué) que l'on veut mettre en compétition et ce, en mesurant la D.O. émise suite à la révélation au moyen des anticorps couplés. Celle-ci sera en effet d'autant plus faible que la compétition pour le même site antigénique entre les deux formes d'anticorps est élevée. Ainsi, en partant d'une concentration constante en anticorps marqués et en faisant varier la concentration en anticorps non-marqués, on pourra évaluer le degré de compétition de ces anticorps (figure 17).

Le choix des concentrations en anticorps marqués se fait en fonction du profil des courbes de titrage précédemment établies pour chacun de ces anticorps. Par contre, la concentration en anticorps non marqués est établie en fonction des valeurs reprises couramment dans la littérature (Garcia-Barreno *et al.*, 1989) (Robinson & Everson, 1992). D'autre part, nous avons veillé à ce que la

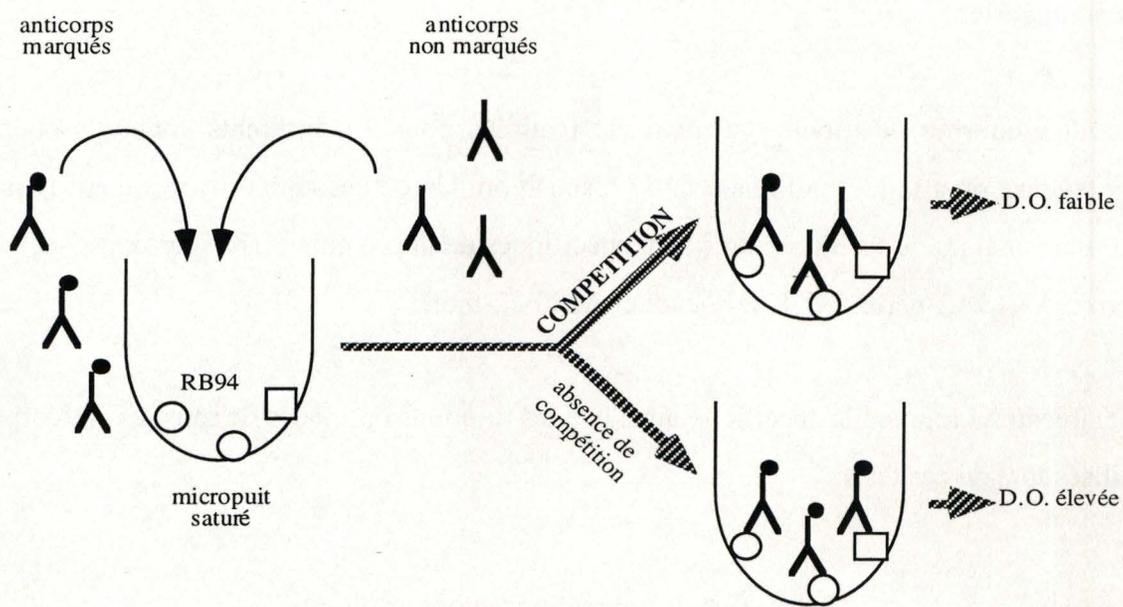


Figure 17: Principe du test de compétition

concentration la plus haute en anticorps compétiteur soit en excès par rapport à la quantité d'anticorps marqués engagée.

A titre de témoin positif, chaque anticorps couplé est testé en compétition contre son homologue non couplé. Les témoins négatifs utilisés lors de ces tests sont les anticorps 1D2G8 (anti-protéine interne du BLV), 1G11 ou 6B7 (tous les deux ciblés contre l'IFN γ). De plus, le 3A11 servira également de témoin négatif pour les tests réalisés avec le 3H4 et le 2D6, et vice-versa. Tous les anticorps ainsi que tous les témoins ont été testés en double. La fixation des anticorps couplés est aussi mesurée en absence d'anticorps compétiteurs, ceci constituant un témoin négatif de compétition.

La compétition sera évaluée la plupart du temps d'une manière réciproque, à savoir que la même paire d'anticorps sera alternativement testée comme anticorps marqué ou comme anticorps compétiteur.

2.4.2.2. Résultats

Le pourcentage de fixation est calculé en fonction du rapport de la D.O. mesurée en présence d'anticorps monoclonaux compétiteurs et de la D.O. mesurée en absence de ces mêmes anticorps monoclonaux compétiteurs. Une fois ces valeurs calculées pour chacune des dilutions testées, on peut établir une courbe de compétition pour chaque anticorps.

Un anticorps est considéré comme étant compétiteur à partir du moment où il arrive à inhiber de plus de 50 % la fixation d'un anticorps marqué sur un antigène. Ce critère a été fixé en fonction du profil observé pour les différents anticorps témoins utilisés au cours des différents tests et en référence aux critères utilisés dans la littérature (Walsh *et al.*, 1986) (Garcia-Barreno *et al.*, 1989).

2.4.2.2.1. Tests de compétition avec les anticorps anti-protéine G.

Dans un premier temps, nous avons donc testé l'anticorps 3A11-perox contre divers anticorps capables de reconnaître des sites différents de la protéine G, à savoir les monoclonaux 20, 57 et 61. Ces trois anticorps sont au départ à une concentration d'au moins 5 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ en fonction des renseignements fournis par le Dr G. Taylor.

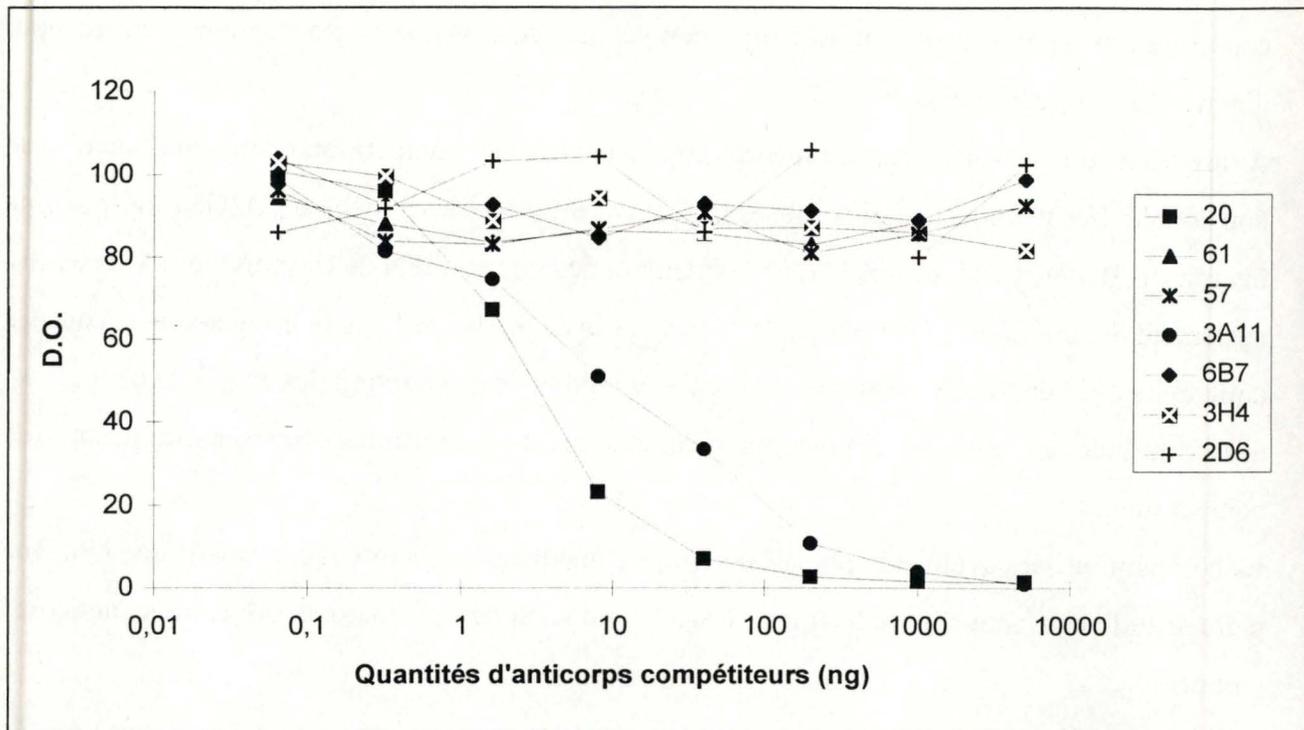


Figure 18: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal 3A11 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés

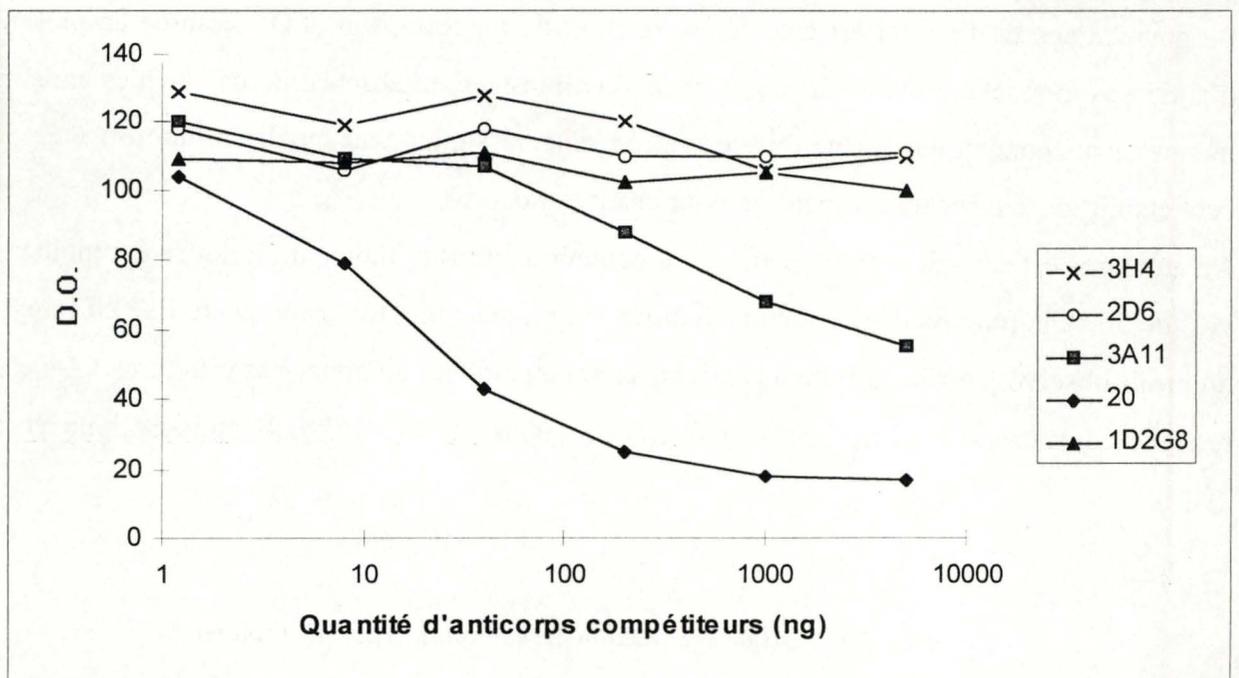


Figure 19: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal 20 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés.

La figure 18 montre les courbes obtenues pour ces anticorps.

On remarque tout d'abord que l'anticorps 3A11 non couplé entre bien en compétition avec sa forme couplée.

Il apparaît que, selon les critères établis, seul l'anticorps 20 est capable d'entrer en compétition avec le 3A11-perox. Il est en effet capable d'inhiber à plus de 50 % la fixation du 3A11-perox sur le RB94 à une concentration de 10 ng/ 100 µl (figure 18). Les autres anticorps sont par contre largement en dessous du seuil fixé.

En vue de confirmer la compétition observée entre ces deux anticorps, le test a été réalisé dans l'autre sens. L'anticorps 20-perox a donc été mis en compétition avec le 3A11. Nos deux autres anticorps monoclonaux (3H4 et 2D6) ont également été testés à titre de témoins négatifs.

Les résultats de ce test indique dans un premier temps que la réciprocité de la compétition n'est pas effective (figure 19). En effet, l'utilisation de 5 µg d'anticorps 3A11 n'inhibe la fixation du 20-perox qu'à 45 %. Cependant, en réalisant le test avec 10 µg de 3A11, nous avons observé une inhibition de la fixation de 56 %. Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que l'anticorps 20 possède une affinité plus forte pour l'antigène que le 3A11 (voir figure 15), l'inhibition de la fixation de cet anticorps requérant dès lors une plus grande concentration de 3A11.

Il sera donc intéressant d'aller plus loin dans la caractérisation de cet anticorps, de manière à montrer s'il reconnaît le même épitope que le 20 (ou un épitope proche).

2.4.2.2.2 Tests de compétition avec les anticorps anti-protéine F

2.4.2.2.2.1. Tests des anticorps 3H4 et 2D6 couplés

Nous avons d'abord testé le 3H4-perox et le 2D6-perox contre divers anticorps reconnaissant la protéine F. Ces deux anticorps ont bien évidemment été mis en compétition l'un contre l'autre, mais également contre les anticorps K3, K5, K115, AK13A2 et AL11C2. Les anticorps témoins utilisés sont le 1G11, le 1D2G8 ainsi que notre anticorps anti-G 3A11. Ces anticorps ont été utilisés à une concentration maximale de 5 µg, à l'exception des anticorps K3, K5 et K115, ceux-ci étant en effet à une concentration de départ de 1 µg/ 100 µl.

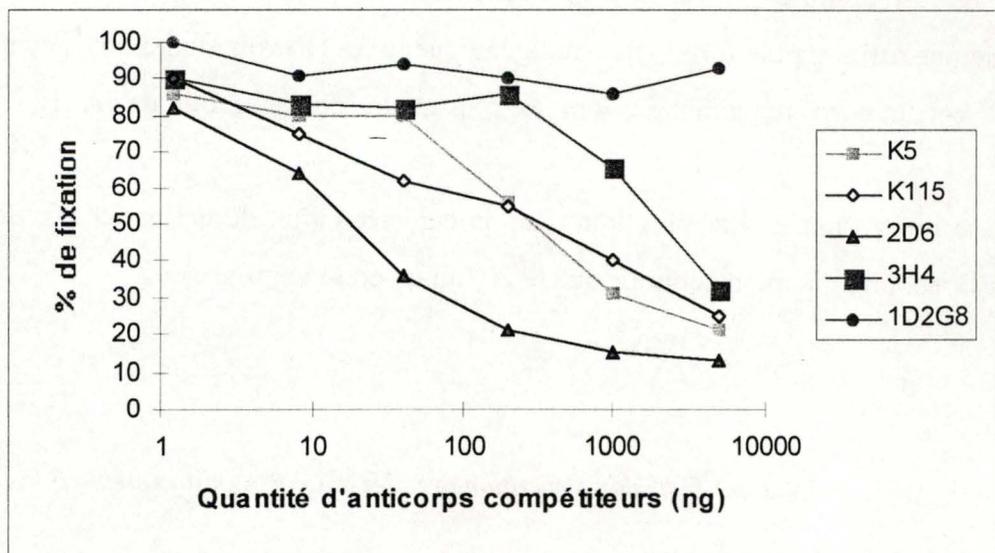
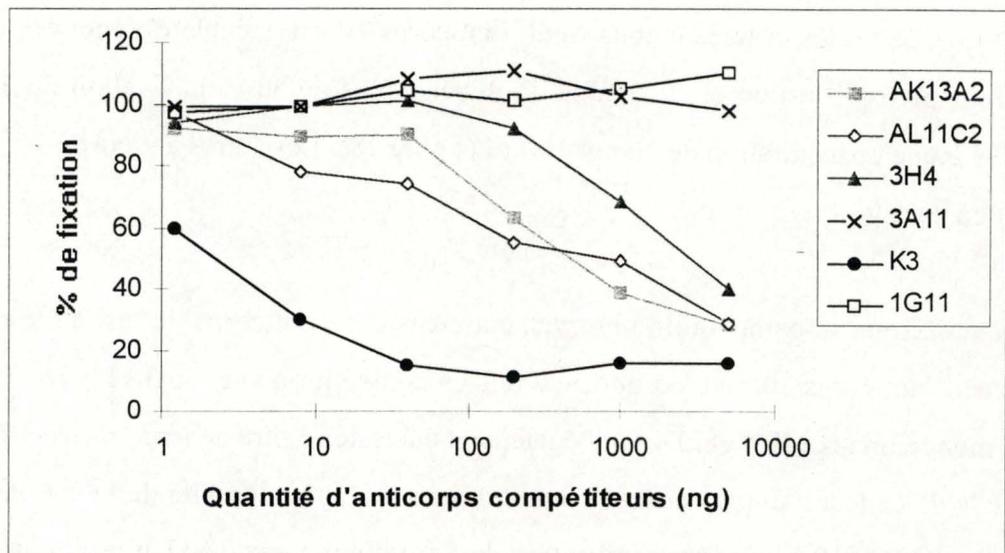


Figure 20: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal 3H4 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés.

Les travaux de Matheise *et al.* (1995) ont permis de définir sur la protéine F deux régions antigénique (A et B) et une région intermédiaire (A/B). L'anticorps AK13A2 a été assigné à la région antigénique A, alors que le AL11C2 reconnaît la région intermédiaire A/B. Les anticorps K3, K5 et K115 ont été caractérisés par le groupe de Kramps (résultats non publiés). Il apparaît que les anticorps K3 et K5 reconnaissent une région antigénique (dénommée A' pour éviter toute confusion avec celle décrite ci-dessus) sur la protéine F distincte de celle reconnue par l'anticorps K115 (B').

Les résultats des tests de compétition effectués avec le 3H4-perox montrent que tous les anticorps testés (exceptés les témoins négatifs) sont capables de rentrer en compétition avec lui (figure 20). Ils inhibent en effet à plus de 50 % la fixation du 3H4-perox sur l'antigène lorsqu'ils sont utilisés à des quantités proche d'1 µg/ 100 µl.

Le test réalisé avec le 2D6-perox conduit aux mêmes conclusions que celles observées avec le 3H4-perox, à savoir que tous les anticorps inhibant la fixation du 3H4, entrent en compétition avec le 2D6 (figure 21).

De ces résultats, nous pouvons également dire que nos deux anticorps entrent en compétition et reconnaissent donc le même site antigénique ou un site proche sur la protéine F.

En vue de montrer la réciprocité de ces résultats pour les autres anticorps, le 3H4 et le 2D6 non couplés ont été mis en compétition avec ces anticorps couplés.

2.4.2.2.2. Test de compétition avec le K3 et le K115 couplés

- le K3-perox

Les anticorps utilisés au cours de ce test sont les anticorps monoclonaux 3H4, 2D6, AK13A2, 3A11 et 1D2G8, ces deux derniers servant de témoins négatifs. Ils ont tous été utilisés à une quantité maximale de 5 µg. A noter que l'anticorps K3, servant de témoin positif, est issu d'ascite non purifiée dont la concentration de départ est estimée à 1mg/ml.

Il apparaît que le 3H4 et le 2D6 sont capables d'inhiber à plus de 50 % la fixation du K3-perox sur le virus RB94 lorsqu'ils sont utilisés aux concentrations maximales (figure 22). A noter que cette compétition reste toutefois assez éloignée de celle obtenue avec le K3 non couplé sur ces deux anticorps monoclonaux. Il était en effet capable d'inhiber (à cette même concentration) à près de 80 % la fixation du 3H4 et du 2D6.

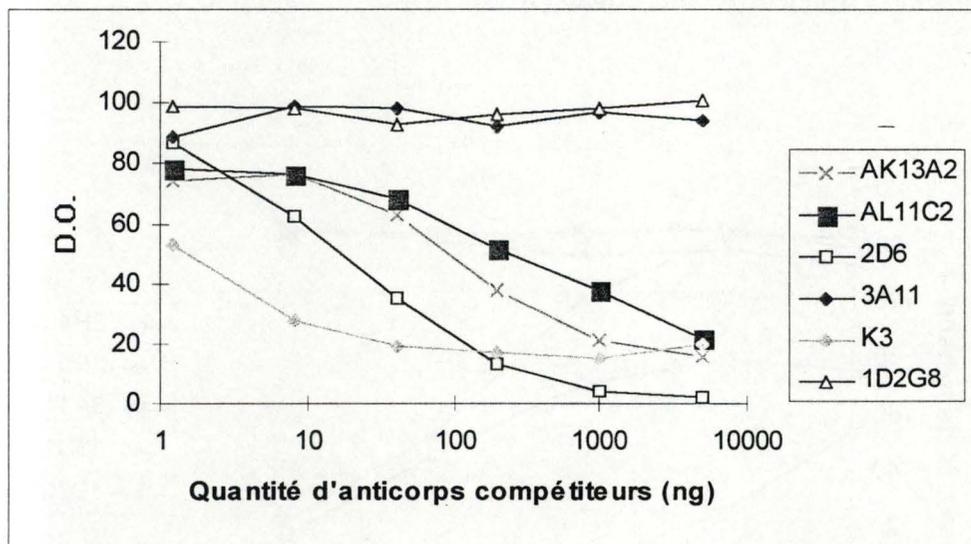
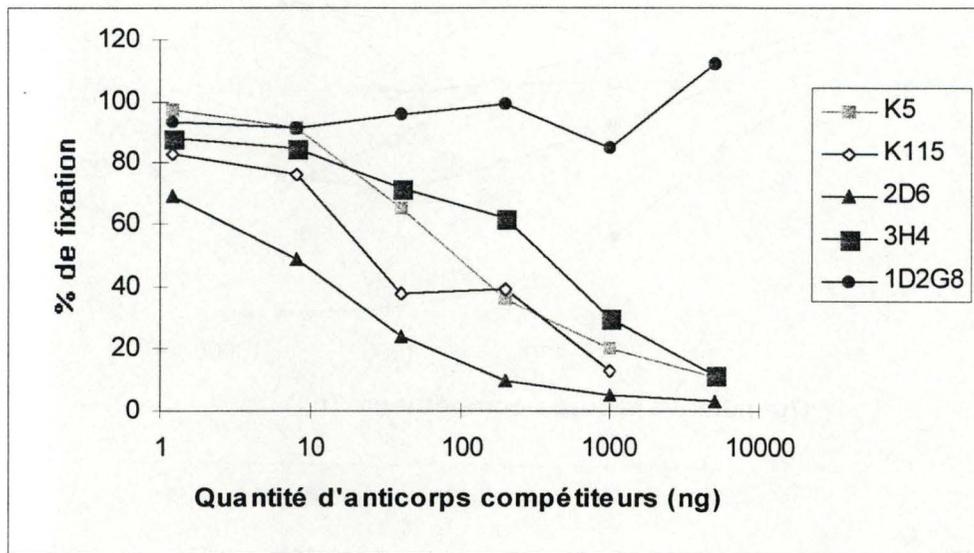


Figure 21: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal 2D6 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés.

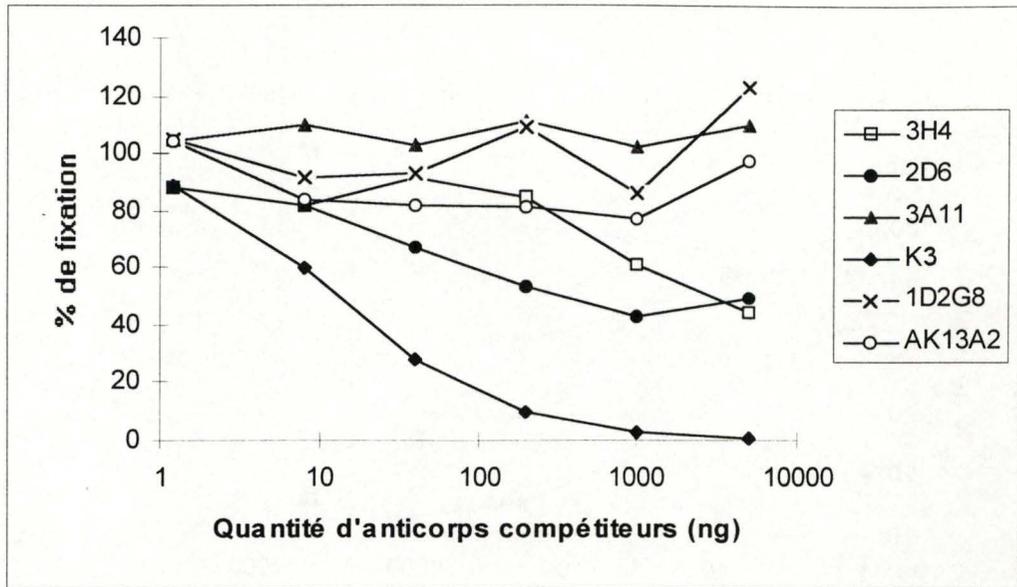


Figure 22: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal K3 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés.

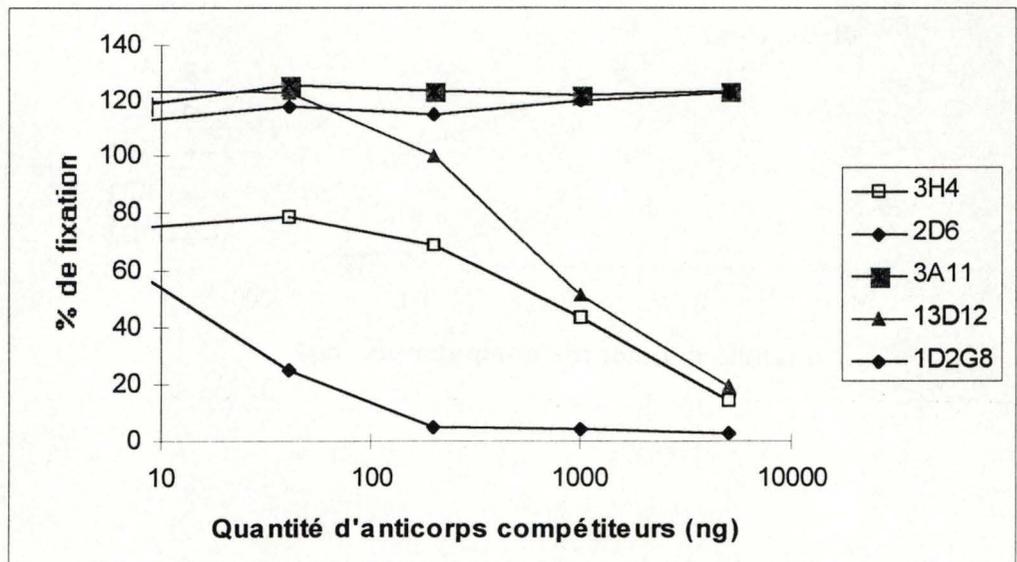


Figure 23: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal K115 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés.

L'AK13A2, quant à lui, n'entre pas du tout en compétition avec cet anticorps K3.

Des tests réalisés avec l'anticorps monoclonal K5-perox (assigné au même site antigénique que le K3 par le groupe de Langedijk (in press)) ont montré des résultats similaires.

-le K115-perox

Ce test a été effectué avec les anticorps monoclonaux 3H4 et 2D6 ainsi que les anticorps 3A11 et 1D2G8 comme témoins négatifs. La figure 23 montre que le 3H4 et le 2D6, à l'inverse des témoins négatifs utilisés, entrent en compétition avec le K115-perox. Il faut toutefois noter que le 3H4 inhibe moins bien la fixation du K115 (63 % maximum) que ne le fait le 2D6 (92 % maximum) à la même concentration. Ceci pourrait être expliqué par la plus faible avidité relative que possède cet anticorps (figure 15).

2.4.2.2.3. Test de compétition avec d'autres anticorps

Disposant également d'anticorps couplés à la biotine ou à la peroxydase et précédemment caractérisés par Matheise *et al.* (1995) comme reconnaissant des sites antigéniques différents de la protéine F, nous les avons inclus dans nos tests de compétition. Il s'agit des anticorps monoclonaux AK13A2-perox, AL11C2-biot et AL13D12-biot. Ne disposant pas d'anticorps AL13D12 non marqué, il n'a pas pu être inclus dans les tests réalisés précédemment avec le 3H4-perox et le 2D6-perox.

Pour la clarté de l'exposé, nous ne détaillerons que les résultats obtenus avec le AL13D12, les résultats obtenus avec les deux autres anticorps étant similaires.

Les anticorps 3H4, 2D6, 3A11 et 1D2G8 ont été testés en compétition avec l'anticorps AL13D12 couplé à la biotine.

Les résultats de ce test montre que les anticorps 3H4 et 2D6, à l'inverse des témoins négatifs, entrent en compétition avec l'anticorps AL13D12 (figure 24). On observe en effet une compétition de plus de 85 % pour l'anticorps 3H4 lorsqu'il est utilisé à une concentration de 5 µg/ 100 µl. Quant au 2D6, il inhibe presque totalement la fixation de l'AL13D12 sur l'antigène lorsqu'il est présent à 200 ng.

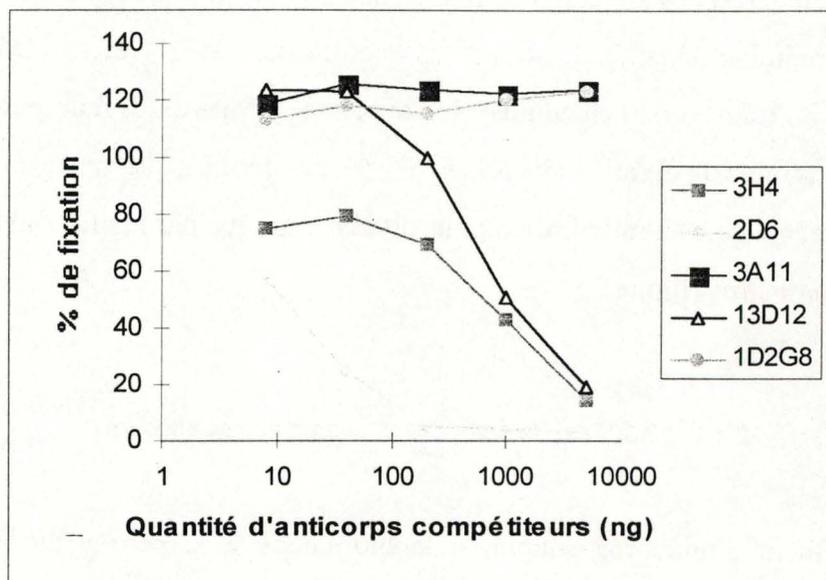


Figure 24: Courbes de compétition de l'anticorps monoclonal AL13D12 couplé à la peroxydase. Elles expriment les pourcentages de fixation de l'anticorps marqué en fonction de quantités croissantes d'anticorps compétiteurs testés.

2.4.2.3. Discussion des résultats obtenus avec le 3H4 et le 2D6

Sans anticipé sur la dernière partie de notre travail; nous pouvons déjà conclure que les deux anticorps monoclonaux anti-protéine F caractérisés lors de ce travail semblent spécifiques d'épitopes proches topographiquement.

Ces résultats sont confirmés par des tests de compétition réalisés avec d'autres monoclonaux (caractérisés précédemment dans notre laboratoire ou dans un autre).

De plus, le site antigénique reconnu par ces anticorps monoclonaux semble constituer un site chevauchant ceux décrits par ces anticorps monoclonaux particuliers.

DISCUSSION

DISCUSSION

Les protéines F et G constituent les cibles essentielles de la réponse humorale (anticorps). En fonction de son degré de conservation, les anticorps dirigés contre la protéine F constituent un outil de choix en matière de détection à large spectre des foyers d'infection. Vu sa forte variabilité, la protéine G est plutôt préconisée pour identifier des différences antigéniques au sein des souches de BRSV.

Dans le cadre de la recherche de moyens prophylactiques, les anticorps monoclonaux dirigés contre ces deux protéines constituent également un intérêt notoire. Rappelons en effet que des tests de transfert passif chez la souris ont montré une influence favorable de certains de ces anticorps sur la protection à l'encontre du RSV (Taylor *et al.*, 1984) (Taylor *et al.*, 1992).

C'est donc dans ce contexte qu'à été envisagé le travail réalisé au cours de ce mémoire.

La première partie du travail s'est focalisée sur la production d'anticorps dirigés contre la protéine G.

Peu d'études font références à la caractérisation de l'ensemble des hybridomes produits au cours de fusions, rendant ainsi toute comparaison difficile. Néanmoins, force est de constater que le panel d'anticorps anti-protéine G dont font part certains auteurs sont généralement issus de plusieurs fusions indépendantes (Taylor *et al.*, 1984) (Tsutsumi *et al.*, 1987). L'obtention d'anticorps monoclonaux ciblés contre cette protéine reste en effet problématique. La majorité de ces fusions ayant été réalisées à partir de souris immunisées avec le virus entier, l'immunogénicité relativement faible de la protéine G par rapport aux protéines F et N pourrait expliquer ces résultats. A titre d'exemple, Furze décrit l'identification d'un seul anticorps anti-G pour quatre fusions réalisées dans ces conditions (Furze *et al.*, 1994).

En vue d'obtenir de meilleurs résultats que ceux décrits ci-dessus, les immunisations des souris ayant servi à nos fusions ont été réalisées à l'aide de protéine G purifiée ou recombinante. Néanmoins, malgré ces dispositions, seul un anticorps monoclonal anti-protéine G a pu être identifié (le 3A11). Les conditions dénaturantes (pH acide, présence de détergent,...) du protocole de purification de la protéine G pourrait altérer son antigénicité et causer ainsi la perte d'épitopes

en raison des perturbations de sa structure tridimensionnelle. Toutefois, il faut signaler que l'analyse de la réactivité des sera des souris immunisées trois fois avec la protéine purifiée indique une spécificité notoire de ceux-ci pour le BRSV et qui plus est pour la protéine G exprimée en baculovirus.

Au vu de ces résultats ainsi que du nombre d'hybridomes dirigés contre ce virus lors du premier criblage de la fusion, les étapes les plus cruciales semblent donc se situer au niveau de leur transfert en macropuits (en présence de milieu classique, non sélectif) ainsi que lors de l'étape de clonage. Plusieurs explications pourraient être avancées pour tenter d'expliquer ce phénomène couramment rencontré lors des fusions réalisées au sein de notre laboratoire. D'une part les hybridomes producteurs d'anticorps dirigés contre la protéine G peuvent être inclus au sein d'une masse importante d'hybridomes non producteurs. Dès lors le transfert en macropuit ou le clonage pourrait ne pas parvenir à isoler ces hybridomes intéressants. D'autre part, le changement de milieu de culture nécessite l'adaptation à de nouvelles conditions pouvant très bien ne pas être supportées par ces hybridomes. A cet égard, lors du clonage ou du transfert en macropuits, les hybridomes se retrouvent en un nombre plus restreint, les privant ainsi des facteurs de croissances générés par la masse d'hybridomes. Ceci peut également être une autre cause aux résultats observés.

Parallèlement à l'obtention du clone anti-protéine G 3A11, un clone anti-F a été détecté (le 3H4). A ces deux anticorps, nous avons ajouté le 2D6 (anti-protéine F) produit antérieurement au laboratoire et n'ayant été que grossièrement caractérisé. Une analyse fonctionnelle et antigénique a été réalisée sur ces trois anticorps.

Des premiers renseignements quant à la nature de l'épitope reconnu par le 3A11 ont été tirés de l'analyse de sa réactivité sur un panel de souches virales. Il apparaît en effet que le 3A11 reconnaît des souches identifiées comme appartenant aux 'groupes' antigéniques A et A/B (Furze *et al.*, 1994) (Prozzi *et al.*, in press), sans pour autant reconnaître celles du 'groupe' B, ni la souche humaine testée (A2). Nous sommes donc en présence d'un anticorps capable de faire la discrimination entre le HRSV et le BRSV, tout en ne reconnaissant que certaines souches bovines. Qui plus est, le profil de réactivité de cet anticorps est identique à celui observé pour l'anticorps 20 dirigé également contre la protéine G et décrit par le groupe de Langedijk (in press).

Une première confirmation des résultats obtenus sur les souches est apportée par l'analyse antigénique de cet anticorps, les tests de compétition montrant en effet dans un premier temps que cet anticorps entre en compétition avec le 20, suggérant ainsi la reconnaissance pour ces deux anticorps d'une même région antigénique sur la protéine G. Ces résultats ne permettent toutefois pas de préjuger de la reconnaissance d'un même épitope par ces deux anticorps non neutralisants.

En effet, les tests de Western-Blotting ont indiqués que le 3A11, au contraire de l'anticorps 20, n'est pas capable de reconnaître la protéine G lorsque celle-ci est présente sous une forme dénaturée.

Ces résultats nous laissent donc penser que notre anticorps monoclonal 3A11 reconnaisse un épitope topographiquement proche mais distinct de celui identifié par le 20. Cet anticorps monoclonal a été situé au niveau des acides aminés 174 à 185 de la région hydrophobe centrale (Langedijk *et al.*, in press).

Ces résultats n'infirment pas les conclusions tirées par le groupe de Melero suggérant que les épitopes conservés entre des souches de groupes antigéniques différents soient localisés au niveau de cette région centrale hydrophobe (Rueda *et al.*, 1991).

Parallèlement à notre travail, une localisation plus précise de l'épitope reconnu par notre anticorps 3A11 a été tentée par le laboratoire du Dr Langedijk (Central Veterinary Institute, Lelystad, Pays-Bas) au moyen d'un test de PEPscan. Celui-ci consiste à évaluer la réactivité de l'anticorps sur de courts peptides (liés à un support solide) se chevauchant de quelques acides aminés et recouvrant l'ensemble de la séquence de la protéine G. Il s'est avéré que le 3A11 ne reconnaît aucun des peptides présentés lors de ce test, confirmant ainsi les résultats du Western-blot selon lesquels la cible de cet anticorps serait un épitope dont la conformation est primordiale pour sa reconnaissance.

Nous disposons donc d'un anticorps monoclonal reconnaissant un épitope proche de la région centrale hydrophobe de la protéine G et capable de faire la discrimination entre les souches bovines A, A/B d'une part et les souches B d'autre part.

Cet anticorps consiste donc un excellent outil en vue d'études à caractères épidémiologique. Il peut en effet servir à l'identification de la présence du virus chez des individus infectés ainsi qu'à la détermination du groupe antigénique de ces souches s'il est utilisé avec d'autres anticorps discriminant.

Qui plus est, en fonction de son avidité relative assez élevée, cet anticorps 3A11 pourra être utilisé notamment en immuno-affinité ou lors de tests de caractérisation de la protéine G.

La caractérisation fonctionnelle des anticorps 3H4 et 2D6 rend compte, comme pour le 3A11, d'une absence d'activité neutralisante de la part de ces anticorps à l'encontre de la souche RB94.

Le test du 3H4 et du 2D6 sur un panel de souches représentatives des différents groupes antigéniques identifiés chez le BRSV a montré tout d'abord que nos deux anticorps possèdent un profil de réactivité différent. En effet, le 2D6 reconnaît toutes les souches bovines testées mais pas la souche humaine, au contraire du 3H4 qui, lui, identifie le HRSV et toutes les souches du BRSV. Il apparaît également que cet anticorps 3H4 réagit sur ces souches de façon semblable à l'anticorps AK13A2 décrit précédemment par Matheise *et al.* (1995).

La spécificité de nos deux anticorps monoclonaux fait qu'ils pourront donc être utilisés dans le cadre d'étude épidémiologiques comme outil de détection à large spectre de la présence du virus chez des bovins susceptibles d'être infectés.

Le fait que le 3H4 et le 2D6 aient une réactivité différente sur ces souches suppose également qu'ils ne reconnaissent pas le même épitope sur la protéine F. Des tests de compétition réciproques réalisés avec ces deux anticorps montrent qu'ils sont tous deux capables d'inhiber mutuellement leur fixation au virus RB94, suggérant dès lors la reconnaissance d'épitopes proches. L'incorporation dans ces tests de différents anticorps préalablement caractérisés par le groupe de Langedijk et dont certains reconnaissent des régions distinctes de la protéine F (K3 assigné au site A' et K115 au site B' décrits par cet auteur) a permis de montrer que nos deux anticorps entrent en compétition avec ces anticorps monoclonaux. Ces résultats suggèrent donc la reconnaissance d'une région antigénique chevauchant ces sites.

Le même type de test, réalisé avec trois anticorps représentatifs des sites antigéniques A, B et A/B décrits par Matheise *et al.* (1995) a permis l'assignation du 3H4 et du 2D6 au site A/B venant ainsi confirmer la reconnaissance d'un site antigénique intermédiaire.

Qui plus est, ces résultats confirment ceux de Matheise *et al.* (résultats non publiés) montrant un effet compétiteur entre les anticorps des sites AB et B (AL11C2 et AL13D12) et ceux des sites A et B de Langedijk (K3 et K115)

Ainsi une correspondance dans ces trois études suggère que tous ces sites décrits sont relativement proches topographiquement.

Sur base de ces résultats, nous pouvons aussi conclure que nos anticorps 3H4 et 2D6 ont un profil comparable à celui observé pour l'anticorps AL11C2, assigné à un site chevauchant les sites A et B. Les travaux de Matheise *et al* (non publiés) ont montré que cet anticorps AL11C2 reconnaît le fragment protéolytique 251-285 de la protéine F et correspondant à la région immunodominante de la protéine F, le site majeur de neutralisation.

On pourrait s'étonner dans un premier temps que nos deux anticorps (de même que le AL11C2), dépourvus d'activité neutralisante, puissent reconnaître des épitopes dans ce site majeur de neutralisation. Toutefois, pareils résultats ont déjà été décrits dans la littérature, notamment par le groupe de Melero (Arbiza *et al.*, 1992). Celui-ci montre en effet l'existence d'un anticorps non neutralisant (le 49F) recouvrant un épitope très semblable à celui assigné à un anticorps neutralisant localisé au niveau de ce site majeur de neutralisation. Qui plus est, cet anticorps 49F ne reconnaît pas la protéine F dénaturée en Western-blot, au contraire de cet anticorps neutralisant.

Un autre exemple rendant compte de l'hétérogénéité de ce domaine peut-être apporté par les résultats de Matheise *et al.* (résultats non-publiés), montrant que l'AK13A2 (assigné au site A et ayant le même profil de réactivité sur les souches que notre 3H4) et que le 4B2 (faisant la discrimination entre souches humaines et bovines comme le 2D6) entrent en compétition et sont également localisés au niveau du site majeur de neutralisation II.

On se rend ainsi compte que des anticorps présentant des caractéristiques fonctionnelles et antigéniques peuvent reconnaître des épitopes différents sur ce site de neutralisation, montrant ainsi l'importante diversité de ce site.

**CONCLUSIONS
ET
PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La réalisation de deux fusions indépendantes nous a permis d'obtenir des anticorps monoclonaux (3H4 et 3A11) dirigés respectivement contre les protéines F et G du BRSV.

Le faible rendement de ces fusions n'est pas sans rappeler les difficultés décrites par d'autres groupes en terme d'obtention d'Ac. Mon. anti-protéine G (Tsutsumi *et al.*, 1989) (Furze *et al.*, 1994). Au vu de l'expérience de notre laboratoire dans le domaine, les différentes pertes émanant du transfert des hybridomes en macropuits ou de la procédure de sous-clonage sont très largement constatées indépendamment de l'Ag-cible de la fusion. Dès lors, les aménagements envisagés pour améliorer le rendement de ces fusions concernent principalement la préparation antigénique à la base de l'immunisation. L'injection de protéine purifiée à partir de lysat viral permet de cibler la réponse contre un constituant viral particulier. Néanmoins, l'efficacité de cette technique (rendement, copurification de protéines associées...) reste faible. De plus, pour l'heure, les protocoles classiques de purification par immunoaffinité se déroulent dans des conditions relativement dommageables (utilisation de détergents puissants, élution à pH acide...) pour la structure tridimensionnelle de la protéine. Or, une majorité des épitopes induisant une réponse-Ac. dépendent de leur structure conformationnelle. Il en résulte donc une perte notable d'immunogénicité. Dans ces conditions, l'utilisation de protéines exprimées dans des cellules eucaryotes (baculovirus, vaccine...) pourrait constituer une alternative intéressante. Disposant de baculovirus exprimant la protéine G, son incorporation dans un protocole complet d'immunisation serait des plus tentantes.

Les informations concernant les 3 Ac. Mon. étudiés (provenant des 2 fusions mentionnées ci-dessus ou d'une autre fusion réalisée avant le début de notre mémoire) dans ce travail ne sont pas pour autant sans intérêt.

Même si quelques analyses complémentaires sont nécessaires (tests sur un panel plus large de souches de RSV), la caractérisation antigénique de ces anticorps nous laissent croire en leur utilité lors d'études à caractère épidémiologique.

Au vu de sa réactivité sur les souches de BRSV et HRSV testées, le 3H4 constitue un outil de choix dans la détection à grande échelle du RSV. Si le 2D6 détecte l'ensemble des souches de BRSV analysées, il n'est pas spécifique de la souche A2 du HRSV. Sous réserve d'une

confirmation de ce profil particulier de réactivité (sur d'autres souches de BRSV, de HRSV mais aussi de ORSV), cet Ac. Mon. pourrait permettre l'identification spécifique d'isolats de BRSV.

En effet, les travaux de Jacobs et Edington (1975) ont montré que des souches de HRSV sont capables de se répliquer chez le bovin, introduisant dès lors un biais lors de ces études épidémiologiques relatives au BRSV.

D'autre part, des Ac. spécifique du BRSV ont été découverts chez des hôtes non naturels de ce virus (chèvres principalement, mais aussi chevaux, chats et chiens) (Van der Poel *et al.*, 1995). Dans le même ordre d'idée, les souches de BRSV se répliquent également chez des moutons infectés expérimentalement (Sharma et Woldehiwet, 1990).

En fonction de la réapparition annuelle du BRSV dans le bétail à certaines époques de l'année, il a été suggéré que certaines espèces mentionnées ci-dessus pourraient faire office de réservoir du virus entre les épisodes infectieux (Van der Poel *et al.*, 1995). Dans ce contexte, le 2D6 pourrait permettre de poursuivre des investigations en ce sens.

Enfin, le 3A11 reconnaît les souches appartenant aux "groupes" antigéniques A et A/B décrits chez le BRSV, mais pas celles du groupe B. Ces caractéristiques font de cet anticorps un outil de choix pour le recensement des différentes souches bovines présentes sur le terrain.

Un tel anticorps discriminant est d'autant plus d'important que des récents travaux menés par notre laboratoire et par celui du Dr. Kramps ont montré des résultats divergents quant à la présence de souches des groupes A et B (détection exclusive de souches A et AB en Hollande et de souches de tous les groupes en Belgique à la même époque) lors d'infections récentes (Schrijver *et al.*, 1995; K. Walravens, résultats non publiés). L'utilisation du 3A11 lors des tests de détection pourrait donc aider à éclairer cette situation, mais aussi d'élargir les connaissances quant à la répartition spatio-temporelle des souches de BRSV.

Plus fondamentalement, la localisation précise de l'épitope reconnu par le 3A11 pourrait aussi compléter les informations sur les zones protéiques impliquées dans la variabilité des souches de BRSV.

A cet égard, si le 3A11 partage certaines caractéristiques avec un Ac. Mon. (20) discriminant les mêmes souches (compétition réciproque pour la fixation à la protéine et activité neutralisante inefficace), l'épitope reconnu paraît néanmoins différent. Ainsi, au contraire du 20, la fixation du 3A11 sur la protéine semble dépendante de la structure tridimensionnelle de celle-ci. A ce titre, la localisation de l'épitope spécifique du 3A11 devra faire appel à des techniques adaptées à

l'identification de déterminants antigéniques conformationnels (par exemple l'expression de fragments de la protéine en système eucaryote).

Les quelques tests de compétition réalisés avec les deux Ac. Mon. anti-protéine F caractérisés dans ce travail suggèrent qu'ils pourraient se fixer à proximité d'épitopes inclus dans le site majeur de neutralisation du RSV. Ce domaine est constitué d'épitopes de structure assez complexe (Lopez *et al.*, 1993). Dans cet ordre d'idée, une localisation plus précise des épitopes du 2D6 et du 3H4 pourront aider à mieux connaître les acides aminés essentiels pour la structure de ce domaine majoritairement impliqués dans l'induction d'une réponse protectrice à l'encontre du RSV.

**MATERIEL ET
METHODES**

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I. Préparation des antigènes pour les immunisations

Avant d'expliquer le protocole de fusion utilisé pour la production des anticorps, il nous faut tout d'abord détailler la préparation des différents antigènes ayant servi à l'immunisation des souris, à savoir la protéine G purifiée à partir d'un lysat de BRSV et la protéine G exprimée en Baculovirus.

1. Préparation de la protéine G purifiée

1.1 Souche virale et lignée cellulaire

La protéine G a été purifiée à partir de la souche de référence RB94 (Wellemans *et al.*, 1975). Cette souche de BRSV a été multipliée *in vitro* sur une lignée cellulaire transformée à partir de fibroblastes de reins de singe vert d'Afrique: les cellules Vero (n° réf. ATCC CRL 1587).

1.2. Multiplication du virus *in vitro* .

Culture de cellules Vero.

Solutions

-Composition du milieu de culture :

500 ml de milieu DMEM (Gibco).

50 ml de sérum de veau foetal préalablement décomplémenté 30 min. à 56°C (Séralab).

5 ml de solution d'antibiotiques / antimycotiques (100 X) composée de 1000 unités de pénicilline, de 10 mg de streptomycine et de 25 µg de fungizone par ml (Gibco).

5 ml de L-glutamine, 250 mM (100 X).

-Composition de la solution de trypsine-EDTA 3X concentrée :

100 ml de trypsine-EDTA (10 X) (Gibco).

233 ml de PBS (Gibco).

Méthode.

-Ensemencer les cellules Vero en flacon de 75 cm² (Gibco) dans 20 ml de milieu de culture.

-Incuber la culture à 37°C dans un incubateur à 5% en CO₂.

-Une fois que le tapis cellulaire est à confluence, rincer celui-ci avec 2ml de solution de trypsine-EDTA (3 x).

-Laver les cellules détachées dans du milieu de culture.

-Après centrifugation à basse vitesse (500 g, 10 min.), remettre le culot de cellules en suspension dans 7 ml de ce même-milieu et répartir dans 7 nouveaux flacons de 75 cm² (Gibco) contenant chacun 19 ml de milieu de culture.

-Incuber la préparation dans un incubateur à 37°C, 5% en CO₂.

Culture du RSV sur les cellules Vero.

Solution.

La composition du milieu d'inoculation est identique à celle du milieu de culture des cellules Vero, excepté la réduction de la concentration en serum de veau foetal à 2,5%.

Méthode.

-Prendre une culture de cellules subconfluentes et rincer les cellules à l'aide de PBS.

- Inoculer le virus dilué en milieu d'inoculation à raison de 0,1 dose infectieuse 50 (TCID₅₀) de RSV par cellule.
- Laisser la préparation 1 h à 37°C pour permettre l'adsorption du virus.
- Eliminer le surnageant de culture et remettre du nouveau milieu d'inoculation (10ml par flacon de 75 cm²).
- Incuber à 37°C jusqu'à ce que de nombreux syncytia bien développés soient observables.
- A ce stade, soumettre la culture à un cycle de congélation-décongélation afin de libérer les virions.
- Récupérer le contenu de la culture lysée et clarifier cette préparation par centrifugation à basse vitesse (500 g, 10 min.).
- La suspension virale ainsi obtenue est titrée par la méthode des dilutions limites puis éventuellement stockée à -70°C.

Détermination du titre viral.

La méthode des dilutions limites se pratique en inoculant une culture cellulaire en microplaques (Nunc) avec des dilutions virales croissantes d'ordre 10. Lors de l'apparition d'effets cytopathogènes spécifiques du virus, le pourcentage de puits infectés est déterminé.

Bien que les effets cytopathogènes soient perceptibles en microscopie optique pour un oeil averti, leur authenticité n'est confirmée que par un test de détection antigénique des monocouches infectées. Celle-ci fait appel à la technique d'immunoperoxydase indirecte (cfr. IV.2) au moyen de l'anticorps monoclonal AK13A2, spécifique de la protéine F du RSV (Matheise *et al.*, 1995).

La dilution pour laquelle 50% des puits présentent un effet cytopathogène correspond à une dose infectieuse 50 (TCID₅₀).

Le développement mathématique permettant le calcul du titre viral est le suivant :

$$\log_{10} \text{ de TCID}_{50} = a + b (s-0.5)$$

avec $a = \log_{10}$ de la première dilution.

$b = \log_{10}$ du facteur de dilution.

s = somme des pourcentages des puits de cellules infectés à chaque dilution.

0.5 = facteur constant à retrancher.

1.3. Purification des protéines G et F

La purification de la protéine G se fait par chromatographie d'affinité. Cette technique consiste à faire passer la culture préalablement diluée en RIPA sur une série de 3 colonnes de Sépharose (Trisacryl) reliées entre-elles.

La première colonne est une PD10 (Sephadex G25) servant à enlever les plus gros débris cellulaires de la préparation.

La seconde colonne (Trisacryl) est une colonne à laquelle sont couplées des immunoglobulines de souris.

La troisième colonne (Trisacryl) est couplée à l'anticorps monoclonal 20 (Langedijk *et al.* a, in press) dirigé contre la protéine G du RB94.

Cette technique peut-être également appliquée à la protéine F, moyennant l'utilisation d'une colonne de Sépharose couplée à un anticorps monoclonal dirigé contre cette protéine (AK8D1, Matheise *et al.*, 1995).

Les colonnes anti-protéine F et anti-protéine G peuvent être couplées de manière à effectuer la purification des deux protéines en une seule procédure.

Solutions

-Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,47 mM
KH_2PO_4	6,46 mM
NaCl	140 mM
KCl	2,68 mM

Porter à 1 l avec de l'eau distillée et ajuster à pH 7,4 avec du HCl 5N.

- Tampon RIPA: -Tris HCl 10 mM

-NaCl	0.15 M
-Désoxycholate de Sodium (FLUKA)	1 %
-Triton X100	1 mM
-PMSF (Phénylméthylsulfonyl Fluoride (SIGMA))	1 mM
-SDS (Sodium Dodécyl Sulfate)	0.1 %

- Tampon d'élution de la protéine F (pH 2.8):

- Glycine	0.1 M
- NP40	0.5 %

- Tampon d'élution de la protéine G (pH 2.8):

- Glycine	0.1 M
- NP40	0.5 %
- NaCl	0.5 M

- Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline):

-Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	1,47 mM
-KH ₂ PO ₄	6,46 mM
--NaCl	140 mM
KCl	2,68 mM

Porter à 1 l avec de l'eau distillée et ajuster à pH 7,4 avec du HCl 5N

Méthode.

- Travailler à 4°C.

- Laver les colonnes avec du tampon RIPA passé sur filtre 0,45 µm.

- Diluer 9 volumes d'échantillon d'échantillon de la suspension virale décrite ci-dessus dans 1 volume de tampon RIPA 10X concentré.

- Ajouter 100 mM de PMSF.

- Laisser passer l'échantillon sur les colonnes.

- Laver les colonnes avec 2 volume de tampon RIPA.
- Eluer les colonnes en utilisant le tampon d'élution adapté au type de colonne (tampon d'élution pour la protéine G ou la protéine F).
- Récupérer l'éluat dans 5 ml de tampon Tris 1M pH8.
- Laver les colonnes avec du PBS-NaN3 0,1%
- Dialyser l'éluat en PBS sur une membrane AMICON (seuil de porosité de 10.000).
- Doser les protéines au moyen d'un kit Micro-BCA (Pierce).
- Stocker les protéines à -20°C.

En vue de concentrer la préparation de protéine, celle-ci peut être précipitée à l'acétone . Pour ce faire:

- Ajouter 5 volumes d'acétone à la préparation.
- Incuber 1 nuit à -20°C.
- Centrifuger 20 minutes à 12000 rpm.
- Resuspendre dans le tampon *ad hoc*.

2. Préparation du baculovirus exprimant la protéine G

Le baculovirus est un vecteur viral utilisé pour l'expression de protéines recombinante dans des cellules eucaryotes et dans lequel le gène codant pour la polyhédrine (protéine fortement exprimée par ce virus) est remplacé par celui codant pour la protéine d'intérêt (Matsuura *et al.*, 1987).

Nous disposons au laboratoire d'un vecteur Baculovirus exprimant la protéine G de la souche NMK7 (Inaba *et al.*, 1970) aimablement fourni par F. Dessy (Division d'Immunologie Animale, CER, Marloie).

Un baculovirus exprimant la protéine F a également été utilisé dans le cadre de ce travail (Walravens *et al.*, in press).

La culture de ce Baculovirus recombinant se fait sur des cellules sf9 issues des gonades de papillon (*Spodoptera frugiperda*)

Méthode.

- Ensemencer les cellules sf9 en flacon de 75 cm² (Gibco) dans 20 ml de milieu de culture TC 100 (Gibco) contenant 10 % de FCS.
- Incuber la culture à 28°C.
- Une fois que le tapis cellulaire est à confluence, centrifuger à basse vitesse (500 g, 10 min.).
- Compter les cellules.
- Déposer le baculovirus recombinant à raison de 0,1 particule virale par cellule.
- Incuber 1 heure dans un faible volume.
- Dès que 20 % de cellules sont infectées, on les centrifuge à basse vitesse (500 g, 10 min).
- Laver 2 X les cellules en PBS stérile.
- Compter les cellules et les resuspendre en PBS stérile à une concentration de 10⁷ cellules/ml.

CHAPITRE II. Immunisations des souris

1. Immunisation

Trois souris BALB/c ont été immunisées avec de la protéine G purifiée à partir du lysat de cellules RB94 précipitées à l'acétone.

Dix microgrammes de protéine G ont été resuspendus dans 250 µl de Quil-A (0.16 mg/ml) en PBS. Après 1h d'incubation à -70°C et centrifugation, la protéine est injectée à chacune des souris par voie sous-cutanée.

Chacune des souris a reçu trois rappels avec la même préparation de protéine G que pour la première immunisation.

Ces rappels ont été effectués par voie sous-cutanée à environ 6 semaines d'intervalle.

2. Dernières stimulations

Dix jours et trois jours avant de réaliser la fusion, la souris utilisée reçoit une dernière fois une injection de protéine G.

Pour la première fusion, la souris a reçu 50 µl d'une solution de Bac-G mélangée dans un même volume de Quil-A (0.33 µg/µl).

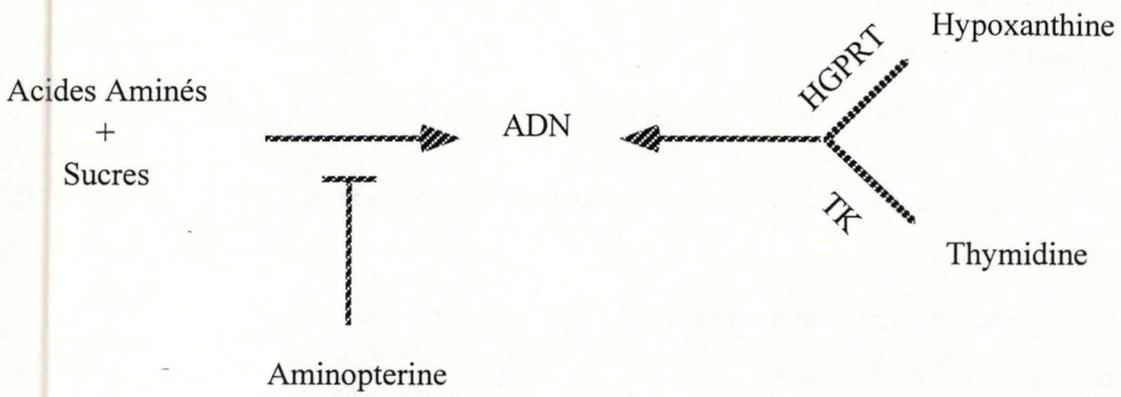


Figure 25 : Représentation schématique des deux voies de synthèse de l'ADN.
 (HGPRT= Hypoxanthine Guanine Phosphorybosyltransférase,
 TK=Thymidine Kinase)

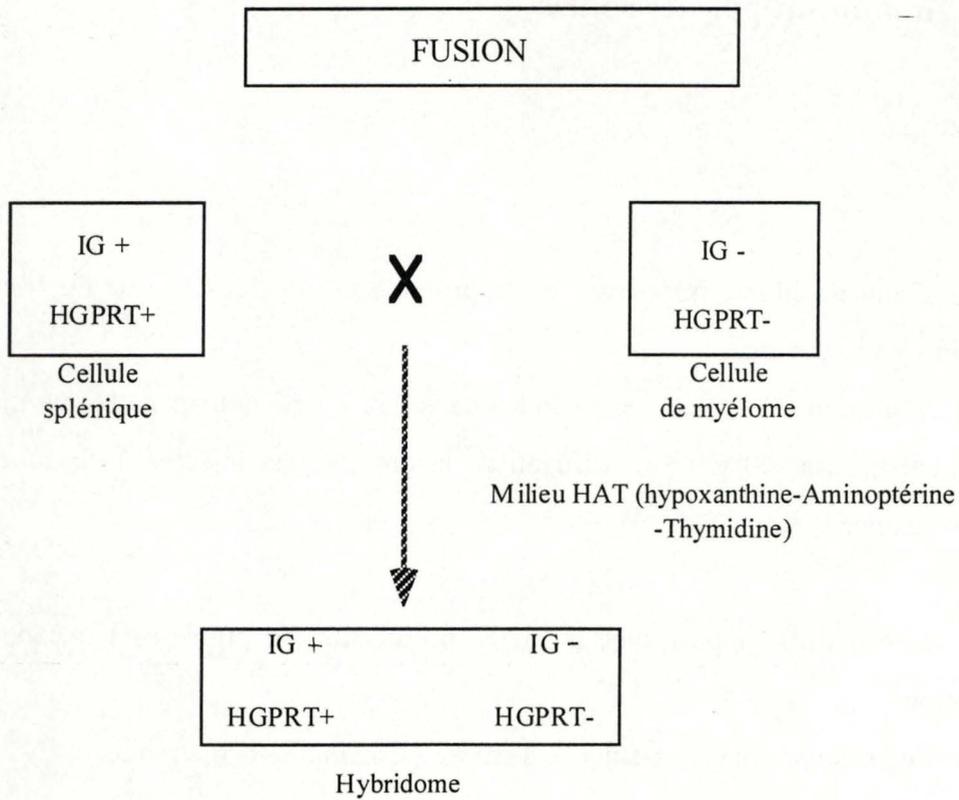


Figure 26: Représentation schématique de la fusion entre une cellule splénique et une cellule de myélome, conduisant à la formation d'un hybridome

La souris utilisée pour la seconde fusion a reçu par contre 35 µg de protéine G purifiée resuspendue dans 250 µl de PBS et de Quil-A (0.16 mg/ml).

L'injection s'est réalisée dans les deux cas par voie intraveineuse et intrapéritonéale.

CHAPITRE III. Production des hybridomes

1. Principe

La fusion entre un lymphocyte B sécréteur d'anticorps (plasmocyte) et une cellule tumorale génère un hybridome ayant gardé les caractéristiques de ces deux types de cellules, à savoir la sécrétion d'anticorps ainsi que la croissance indéfinie.

Elle se réalise au moyen de polyéthylène glycol (PEG), substance relativement hydrophobe et permettant la fusion des membranes cellulaires.

Le processus de fusion étant relativement inefficace, il est nécessaire de conférer un avantage sélectif aux hybridomes par rapport aux cellules non-fusionnées. La sélection chimique opérée est basée sur l'inhibition des voies de synthèse de l'ADN et se réalise au moyen d'un milieu sélectif HAT de Littlefield contenant de l'hypoxanthine, de l'aminoptérine et de la thymidine.

Il existe en effet deux voies indépendantes permettant aux cellules la synthèse d'ADN (figure 25). La première, tout à fait classique, utilise les sucres et les acides aminés pour l'élaboration des différents acides nucléiques. La seconde est une voie de sauvetage reposant sur l'utilisation de thymidine et d'hypoxanthine par deux enzymes, la TK (Thymidine Kinase) et l'HGPRT (Hypoxanthine-Guanine Phosphorybosyltransférase).

L'aminoptérine présente dans le milieu est capable de bloquer la première voie de synthèse de l'ADN, obligeant dès lors les cellules à emprunter la voie de sauvetage.

L'utilisation d'une lignée de cellules de myélome déficiente en HGPRT ne permet la survie de ces cellules (bloquées dans les deux voies) qu'à la seule condition où elles arrivent à fusionner avec une autre cellule possédant cette enzyme (figure 26).

Dès lors, en déposant sur un tel milieu, un mélange de cellules tumorales et de plasmocytes, ne pousseront que les hybridomes issus de la fusion de ces deux types de cellules.

Les plasmocytes non fusionnés, dont durée de vie est limitée dans ce type de milieu, seront rapidement éliminés.

2. Choix du myélome

Le myélome utilisé appartient à la lignée SP20-Ag14 et n'est pas producteur d'Ig. Il est dérivé d'un hybridome X63-Ag8X BALB/c.

Les cellules du myélome sont cultivées à 37° C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂ sur milieu RPMI total.

3. Milieux de culture

- RPMI minimal

RPMI 1640 (Gibco) auquel on ajoute: -4,77 g Hepes (SIGMA)
-0,85 g NaHCO₃ (Merck)

-10 ml de glutamine 200mM (Gibco)

-10 ml de pyruvate de sodium (GIBCO)

-10 ml de mélange péniciline,
streptomycine (Gibco)

Le tout, est amené à pH 7,4 et filtré sur un dispositif Sartorius équipé d'une membrane de 0,2 µm.

-RPMI total

RPMI minimal auquel on ajoute 10 % de FCS (Foetal calf serum) préalablement décomplémenté pendant 30 min. à 56°C

La mise à pH et la filtration s'effectuent comme décrit auparavant

-milieu HAT

Préparé en ajoutant 2% de HAT concentré 50X (Gibco) au RPMI total.

-milieu HT

Préparé en ajoutant 2% de HT concentré 50X (Gibco) au RPMI total.

4. Protocole de fusion

4.1. Préparation des cellules nourricières

Après la fusion, les cellules sont déposées dans des plaques multipuits (Nunc) contenant des cellules péritonéales de rats (feeder layers) qui produiront des facteurs de croissance pour les cellules et contenant des macrophages chargés d'éliminer les débris cellulaires.

Méthode

-Injecter 5ml de RPMI total stérile et glacé dans la cavité péritonéale d'un rat tué peu avant.

-Après massage de l'abdomen, récupérer le liquide injecté par ponction.

-Centrifuger les cellules obtenues et resuspendre dans du milieu de culture de manière à obtenir une concentration de 10^6 cellules/ml

-Répartir les macrophages dans des microplaques à raison de 50 μ l/puits.

4.2. Préparation des splénocytes

La rate étant le site préférentiel de localisation des plasmocytes, celle-ci est prélevée de façon stérile chez la souris immunisée et ayant été préalablement restimulée.

La rate est broyée dans un potter en présence de NH_4Cl (8,3 g/l, pH 7) de façon à assurer la lyse des globules rouges.

On centrifuge ensuite pendant 10 min. à 500g, le culot étant resuspendu en RPMI minimal. Cette étape est renouvelée deux fois.

4.3. Préparation du myélome

Avant la fusion, le myélome, maintenu en culture est lavé en RPMI minimal pour éliminer les cellules mortes.

Les cellules sont centrifugées pendant 10 min. à 500g, le culot étant resuspendu RPMI minimal. Cette opération est répétée 2 fois.

4.4. Fusion proprement dite

- Compter les splénocytes et les cellules de myélome.
- Ajuster ces cellules dans un rapport de 1 cellule de myélome pour 4 splénocytes.
- Déposer les cellules dans un tube conique de 10 ml.
- Centrifuger 10 min à 500g.
- Eliminer le surnageant et ajouter au culot 1 ml de PEG 1500 (Gibco) goutte à goutte et sous agitation.
- Diluer le PEG en ajoutant progressivement 7,5 ml de RPMI minimal tout en maintenant l'agitation
- Ces deux dernières étapes sont réalisées à 37°C.
- Centrifuger 10 min à 500g.
- Resuspendre en RPMI total
- Incuber 2h à 37°C
- Centrifuger 10' à 500g.
- Resuspendre le culot en milieu HAT à raison de 10^6 cellules par ml.
- Déposer 100µl de cellules par puits, sur les microplaques contenant les cellules nourricières
- Incuber dans une étuve à 37°C avec une atmosphère enrichie à 5% de CO₂.

Après 10 jours de culture, différents tests antigéniques sont réalisés de manière à pouvoir sélectionner les hybridomes sécréteurs d'anticorps intéressants.

Les hybridomes sont ensuite transférés en macropuits et mis en culture une dizaine de jours sur un milieu dépourvu d'aminoptérine, celle-ci étant à la longue toxique pour les cellules.

Après une seconde sélection antigénique, les hybridomes vont pouvoir être clonés.

4.5. Clonage des hybridomes par la méthode des dilutions-limites.

Les surnageants d'hybridomes présentent le risque de contenir des immunoglobulines produites par plusieurs clones cellulaires différents. Il est donc nécessaire de sélectionner uniquement un seul clone spécifique du RSV.

D'autre part, pour la suite de notre travail, il était également indispensable d'obtenir des clones stables en culture et dotés d'une capacité sécrétrice maximale.

Tous les hybridomes anti-RSV dont nous disposons ont ainsi été clonés en dilutions-limites selon le protocole suivant :

- Mettre préalablement en culture en micropuits des cellules péritonéales de rats à la densité de 10^6 cellules/ml.
- Diluer les cellules hybrides (mises au préalable à proliférer en macropuits) jusqu'à obtenir des concentrations théoriques respectives de 100, 10 et 1 cellule/ml de milieu de culture.
- Déposer alors 100 μ l de ces différentes dilutions dans les micropuits couverts d'une couche nourricière.

Après quelques jours de culture à 37°C, les colonies s'étant développées dans les micropuits ayant reçu la dilution la plus importante sont considérées comme monoclonales.

Chaque clone est alors amplifié et le surnageant résultant de sa mise en culture est testé afin de vérifier l'efficacité de sa capacité sécrétrice anti-RSV.

La détection des clones sécrétoires spécifiques des différentes souches de RSV repose sur un test en ELISA indirect sur le virus RB94.

Les sous-clones les plus intéressants pour chaque hybridome sont maintenus en culture dans le but de récupérer leur surnageant pour les tests futurs. Ces mêmes-clones sont également congelés suivant la procédure décrite ci-dessous.

4.6. Congélation et décongélation des hybridomes

La production de clones sécrétant des Ac. Mon. anti-RSV n'a de sens que si ceux-ci peuvent être conservés à long terme et réamplifiés à la demande. C'est dans cette optique que l'ensemble des hybridomes (et des sous-clones) sélectionnés sont traités pour une conservation dans l'azote liquide.

4.6.1. Congélation

Solution

Milieu de congélation :

- 10 ml de Diméthyl-sulfoxyde (DMSO) (Merck).
- 90 ml de sérum de veau foetal.

Méthode

- Lorsque les cellules sont à confluence, centrifuger celles-ci 10 min. à 500g.
- Remettre en suspension le culot cellulaire dans un ml de milieu de congélation à 4°C.
- Refroidir la préparation cellulaire dans un congélateur (-70°C).
- 24 h plus tard, déposer les cryotubes dans l'azote liquide.

4.6.2. Décongélation

- Décongeler les hybridomes en incubant 1 minute les cryotubes dans un bain à 37°C.
- Verser le contenu dans 5ml de milieu de culture (sans FCS).

-Centrifuger 10 min. à 500g.

-Resuspendre le culot dans du milieu de culture à concentration désirée.

4.7. Production d'anticorps monoclonaux *in vivo* .

Certains tests exigeant la purification d'une quantité importante d'anticorps (de l'ordre du mg/ml), il était indispensable d'aborder une technique de production plus efficace que la simple récolte de surnageant de culture des hybridomes (dont la concentration en anticorps excède rarement 30 µg./ml).

Une fois injectées dans la cavité péritonéale de souris, les cellules hybrides ont en effet la capacité d'y proliférer et de provoquer le développement de tumeurs. Le prélèvement de ce liquide péritonéal permet l'obtention d'anticorps monoclonaux à des concentrations de l'ordre du mg/ml.

Méthode

-Stimuler les souris BALB/c par l'administration intrapéritonéale de 0,5 ml de Pristane (2,6,10,14-Tétraméthyl pentadécane, Aldrich).

-Une semaine plus tard, injecter 2×10^6 cellules hybrides dans la cavité péritonéale de ces souris.

-5 à 11 jours après l'injection, alors que l'ascite se manifeste par un gonflement de l'abdomen, ponctionner le liquide d'ascite au moyen d'une aiguille plantée dans la cavité péritonéale.

-Centrifuger le liquide d'ascite 10 min. à 500g.

-Ecarter le culot et le ménisque (riches respectivement en cellules et en graisse).

4.8. Détermination des isotypes

La connaissance de l'isotype des différents Ac. Mon. produits étant essentielle pour leur purification, la classe et la sous-classe de ces immunoglobulines ont été déterminées par test ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay).

Solutions

-Préparation d'hydrolysate de caséine

- Dissoudre 25 gr. de caséine bovine (Fluka) dans 800 ml de NaOH 0,3N.
- Agiter une nuit à 37°C.
- Ajuster à pH 7 avec du HCl 12N et porter ensuite à 1l. avec de l'eau distillée.
- Aliquoter et congeler à -20°C.

Avant utilisation, la solution d'hydrolysate de caséine est diluée 2X en PBS.

-Composition de la solution de révélation n°1:

Tampon citrate 50 mM pH 4,2	9 ml
OPD (Ortho Phénylène Diamine) à 4 mg/ml d'H ₂ O	1 ml
H ₂ O ₂ 30%	2 µl

Méthode

-Adsorber une nuit à 4°C dans les puits d'une microplaque (Immuno Plate Maxisorp, Nunc) un antisérum de lapin dirigé contre les immunoglobulines de souris à raison de 10 µg/ml (100 µl/puits).

-Eliminer la solution de "coating" et laver 6X en PBS-Tween 0,1%.

-Saturer ensuite la microplaque avec une solution d'hydrolysate de caséine (150 µl/puits).

-Distribuer 100 µl des surnageants des différents hybridomes clonés dans chaque puits.

-Incuber 1 h à température ambiante.

-Après avoir lavé la microplaque 6X en PBS-Tween 0,1%, déposer 100 µl/puits d'antisérums de chèvre anti-isotypes de souris (anti-immunoglobulines de type G₁, G_{2a}, G_{2b}, G₃, M et A)

conjugués à la biotine (Amersham). Les antiséras sont dilués 1000X dans de l'hydrolysat de caséine.

-Incuber 1h. à température ambiante.

-Laver à nouveau la microplaque 6X en PBS-Tween 0,1%.

-Ajouter 100 µl/puits de streptavidine couplée à la peroxydase (Amersham), en solution à 1/1000 dans de l'hydrolysat de caséine.

-Incuber la préparation 1 h à température ambiante.

-Laver 6X en PBS-Tween 0,1%.

-Mettre en évidence les complexes-immuns avec la solution de révélation n°1.

-Après 10 min, arrêter la réaction en ajoutant 50 µl de H₂PO₄ 2M.

4.9. Purification des liquides d'ascites par chromatographie d'affinité.

Les anticorps monoclonaux caractérisés au cours de notre travail ont été purifiés par chromatographie d'affinité.

Son principe est basé sur la propriété d'une protéine de *Staphiloccocus aureus* du groupe A (protéine A) de fixer les fragments Fc de cette classe d'immunoglobulines. Le couplage de cette protéine sur une colonne Sépharose 4 Fast Flow (Pharmacia, LKB) permet la purification par chromatographie d'affinité des Ac. Mon.

Solutions

-Tampon de couplage: - Glycine 1.5 M
 - NaCl 3M

- Tampon Phosphate 0,02 M pH 7: - NaH₂PO₄ 0.02 M
 - Na₂HPO₄ 0.02 M

Méthode

- Equilibrer la colonne de protéine A couplée au sépharose avec le tampon de couplage.
- Diluer 2X le liquide d'ascite avec le tampon de couplage et le passer sur filtre 0,45 μm (Gelman Sciences USA).
- Appliquer la solution sur la colonne de protéine A-Sépharose à raison de 2ml de solution d'anticorps monoclonaux par ml de colonne.
- Eliminer les protéines adsorbées non spécifiquement par lavage de la colonne au moyen de tampon de couplage, le passage à travers la colonne étant contrôlé par un spectrophotomètre .
- Eluer les IgG fixées avec un tampon glycine 0,1M , pH= 2,8
- Recueillir les fractions recouvrant le pic d'Ig.
- Porter immédiatement à pH = 7,4 en ajoutant du Tris-HCl 1M pH 8.
- Régénérer la colonne avec du tampon citrique 0.1 M pH3 et ensuite avec de l'acide acétique 1 M
- Les anticorps sont ensuite dialysés et concentrés sur une membrane Amicon (seuil de porosité de 50.000) en tampon PBS.

CHAPITRE IV. Tests de caractérisation des anticorps

Différents tests de détection ont été utilisés tant en matière de sélection des hybridomes producteurs que de caractérisation plus approfondie de leur spécificité

1. Test en ELISA indirect

Les antigènes utilisés lors des différents tests ELISA indirects réalisés au cours de ce travail sont:

- les protéines F et G purifiées dont les préparations ont été décrites au point I.1.3.

Ces deux protéines ont été utilisées en déposant dans chacun des puits 50 µl d'une solution à 10 µg/ml.

- le Bac-G, le Bac-F et le Bac-wt. La préparation de ces antigènes est identique à celle décrite au point I.2., mis à part le fait qu'après infection les cellules sont centrifugées à basse vitesse, resuspendue en PBS-NP40 1 % et incubé 1 heure à 4°C. Après une dernière centrifugation, les lysats sont aliquotés et stockés à -20°C. On dépose 50 µl/puit de ces préparations diluées 200 X en PBS.

- le virus RB94. On utilise une culture virale de RB94 réalisée de la même façon que celle décrite au point I.2..Ensuite , la procédure est la suivante:

-Après développement des syncytia, soumettre la culture à un cycle de congélation-décongélation afin de libérer les virions.

-Récupérer le contenu de la culture lysée et clarifier cette préparation par centrifugation à basse vitesse (500 g, 10 min.).

-Centrifuger à vitesse très importante (90000 g) la préparation pendant une nuit afin de sédimenter les particules virales.

-Resuspendre le culot dans une solution de N-octyl-glycopyrannoside (diluée à 1% en PBS) de sorte à obtenir un volume équivalant au 25^{ème} de celui de départ.

-Aliquoter cette préparation et congeler à -20°C.

-La préparation antigénique est rediluée à 1/100 en PBS avant emploi.

Méthode

- Déposer chacun de ces antigènes dans les puits pendant une nuit à 4°C.

- Laver 3 X les plaques avec du PBS-Tween 0,1 %.

- Saturer 1h avec 100 µl d'hydrolysate de caséine .

- Déposer 50 µl d'anticorps à tester pendant 1h.

- Laver au PBS-Tween 1/1000.

- Déposer pendant 1h l'anticorps secondaire (anti-Ig de souris couplé à la peroxydase) dilué 1000 X dans l'hydrolysate de caséine.

- La révélation se fait avec la solution de révélation n°1.
- Arrêter la révélation après 10 minutes au moyen d'H₂SO₄ 2N.

2. Test sur monocouches de cellules infectées

La préparation du virus est la même que celle décrite au point I.2. excepté le fait que les cellules Vero sont cultivées en monocouches sur des plaques multipuits. Après 3 jours d'infection, les plaques sont fixées à l'acétone 90 % glacial et la variabilité des Ac. Mon. a été testée à leur rencontre.

Les souches de BRSV utilisées pour les différentes infections sont les souches RB94 (Wellemans *et al.*, 1975), Bov-X (Paccaud & Jacquier, 1970), WBH (CVI; Lelystad), NMK7 (Inaba *et al.*, 1970).

La souche A2 (Lewis *et al.*, 1961) du HRSV (prototype du groupe A) a aussi été incluse dans ces tests antigéniques.

Solutions.

-Solution de révélation n°2:

AEC (3-amino 9-éthyl carbazole, Sigma)	
dilué à 4 mg./ml dans du N,N diméthylformamide ou DMF (Sigma)	0,5ml
Tampon acétate de sodium 0,005 M, pH 5	9,5 ml
H ₂ O ₂ 30%	3 µl

Méthode

-Réaliser une infection virale de monocouches de cellules subconfluentes dans des microplaques de manière semblable au protocole décrit précédemment.

- Après développement d'effets cytopathogènes, éliminer le surnageant de culture et fixer les cellules infectées à l'aide 100 μ l d'isopropanol pendant une nuit à 4°C.
- Laver 3X en PBS.
- Éliminer les sources de fixation non spécifique en ajoutant 200 μ l/puits de solution d'hydrolysat de caséine.
- Incuber 1h. à température ambiante.
- Éliminer la solution de saturation et déposer 100 μ l/puits de surnageant de culture des hybrides à tester.
- A l'issue d'une incubation d'1h, laver 3X la préparation en PBS.
- Révéler la présence d'anticorps fixés sur leur cible par des immunoglobulines de lapin anti-immunoglobuline de souris conjuguées à la peroxydase (le conjugué étant dilué au 1/500 dans de l'hydrolysat de caséine) (Amersham International).
- Incuber 1 h. à température ambiante.
- Laver 3X en PBS.
- Mettre en évidence les immuns-complexes formés à l'aide de la solution de révélation n°2 (100 μ l/puits).
- Examiner les résultats en microscopie optique.

3. Tests en dot-blot

Ce test consiste à évaluer la réactivité des anticorps monoclonaux sur des antigènes préalablement adsorbés sur nitrocellulose.

Les tests en dot-blot ont été réalisés avec les protéine F et G purifiées du virus RB94.

Méthode

- Précipiter les antigènes dans 6 volumes d'acétone pendant 1 nuit à -20°C.

- Centrifuger 2 X 5 min les échantillons à 11.000g
 - Resuspendre les antigènes en PBS.
 - Déposer 1 µg de protéine sur une membrane de nitrocellulose de 1 cm²
 - Laisser sécher.
 - Saturer 1h avec 150 µl d'hydrolysate de caséine.
 - Déposer les anticorps à tester pendant 1h.
 - Laver au PBS-Tween 0,1 %.
 - Déposer pendant 1h l'anticorps secondaire (anti-Ig de souris couplé à la peroxydase) dilué 1000X l'hydrolysate de caséine.
- La révélation se fait avec la solution n°2.

4. Tests de Western-Blotting

Cette technique met aussi en oeuvre la détection des antigènes sur membrane de nitrocellulose. Néanmoins, les protéines sont ici préalablement séparées par migration électrophorétique sur gel de polyacrylamide .

Migration des protéines

Ce mode opératoire permettant une séparation des protéines sur base de leur masse moléculaire, nous faisons également migrer parallèlement aux échantillons des protéines-étalons de Masse Moléculaire connue.

L'électrophorèse se déroule sur des gels à 12% en polyacrylamide adaptés pour la séparation des protéines dont les poids moléculaires s'échellonnent entre 10000 et 150000. Afin d'obtenir un front de migration concentré, le gel de séparation est surmonté d'un gel d'empilement.

Solutions.

-Composition du tampon échantillon pour SDS-PAGE (Laemmli, 1970):

Tris-HCl pH = 6,8.	0,0625M
Glycérol	10%

SDS	2%
2-mercaptoéthanol	5%
Bleu de bromophénol	0,000125 %

Transfert sur feuille de nitrocellulose

Après une migration de 30 min à 200V, le gel est détaché de son support plastique et accolé à une membrane de nitrocellulose. Le montage est placé dans un champs électrique (la feuille de nitrocellulose du côté de l'anode) de manière à induire le transfert des protéines (chargées négativement suite au traitement avec le SDS) du gel vers la feuille de nitrocellulose.

Solution

Tampon de transfert:

-Tris	25 mM
-Glycine	150 mM
-Méthanol	20 %

Méthode

- Après électrophorèse, démouler et équilibrer le gel dans du tampon de transfert.
- Mettre alors le gel en contact étroit avec une feuille de nitrocellulose équilibrée dans le même tampon.
- Placer le dispositif dans le trans-Blot Cell (Bio-Rad) et soumettre celui-ci à un champs électrique de 50 Volts pendant 2 heures.
- Après transfert, isoler la piste des étalons de masse moléculaire et plonger celle-ci dans une solution de coloration (50 % éthanol, 10% acide acétique, 0,1 % amido black).
- Saturer le reste de la feuille de nitrocellulose dans de l'hydrolysate de caséine pur une nuit à 4°C.
- La révélation des bandelettes de nitrocellulose se fait de la même manière que pour le dot-blot.

5. Tests de séroneutralisation

- Mettre en contact 100 μ l de virus RB94 (à 100 TCID₅₀/ml de milieu) avec un même volume de surnageant de culture provenant des différents clones testés.
- Incuber 2 h à température ambiante.
- Déposer 100 μ l de ces solutions sur des cultures de cellules Vero réalisées en microplaques.
- Après une nouvelle incubation de 2 h à 37°C, remplacer le milieu par du milieu d'inoculation.
- Incuber 3 jours à 37°C.
- Fixer les cellules à l'acétone glacial à 90 % et révéler la présence d'effets cytopathogènes à l'aide d'un Ac. Mon. spécifique de la protéine F de la même façon que pour un test sur monocouches de cellules infectées.
- Observer le pouvoir neutralisant des anticorps, par rapport à un anticorps-témoin.

6. Tests de compétition

Des tests de de compétition entre différents anticorps monoclonaux ont permis d'identifier les sites antigéniques reconnus par nos anticorps monoclonaux. ce test se réalise en évaluant le pouvoir d'un anticorps monoclonal (compétiteur) à inhiber la fixation d'un autre anticorps couplé à un enzyme. Dans un premier temps, nos anticorps ont donc été couplés à la peroxydase.

6.1. Couplage des Ac. Mon. à la peroxydase

Méthode

- Dissoudre deux mg de peroxydase (Biochemica, Boehringer) dans 0,5 ml d'eau distillée.
- Ajouter 0,1 ml d'une solution de NaIO₄ 0,2 M fraîchement préparée.

- Incuber 20 min. à température ambiante.
- Dialyser ensuite la solution une nuit contre du tampon acétate 1 mM, pH 7,5.
- Ajuster le pH à 9-9,5 avec plus ou moins 10 µl de tampon carbonate 0,2 M, pH 9,5.
- Ajouter 4 mg d'Ig G dissoutes dans 0,5 ml de tampon carbonate/bicarbonate 10 mM, pH 9,5.
- Après avoir vérifié le pH du mélange (9-9,5), incuber 2 heures à température ambiante.
- Ajouter 0,05 ml de solution de NaBH₄ (4 mg/ml) pour atteindre une concentration finale de 0,18 mg/ml.
- Dialyser le mélange une nuit à 4°C contre du PBS, pH 7,5.
- Pour la préservation du conjugué, mélanger celui-ci avec une solution de glycerol de sorte à obtenir un rapport pondéral glycerol/conjugué valant 1/5.
- Stocker ensuite les Ac. Mon. couplés à -20°C.

6.2. Optimisation des conditions d'utilisation des anticorps couplés

Après couplage, les anticorps conjugués ont été analysés de manière à évaluer leur dilution optimale d'utilisation dans le cadre de test ELISA.

Méthode

- Adsorber une nuit à 4°C la préparation de RB94 à raison de 100 µl/puits.
- Laver la plaque 6X en PBS-Tween 0,1%.
- Saturer ensuite la microplaque avec de l'hydrolysate de caséine (150 µl/puits).
- Incuber 2 heures à température ambiante.
- Laver les puits 6X avec du PBS-Tween 0,1%.
- Ajouter 100 µl/puits de conjugué préalablement dilué en hydrolysate de caséine.
- Incuber une heure à température ambiante.

-Laver 6X en PBS-Tween 0,1%.

-Mettre en évidence les complexes-immuns avec la solution de révélation n°1.

-Après 10 min, arrêter la réaction avec 50 μ l de H₂SO₄ 2N

6.3. Tests de compétition proprement dits

Le protocole de compétition fait appel à des modalités identiques (Ag de "coating", saturation, lavage et révélation des complexes immuns), les Ac. Mon.-test couplés étant cette fois mis en présence de dilutions graduelles d'anticorps monoclonaux compétiteurs (au départ à une concentration de 5 μ g/ 100 μ l).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Akerlind B, Norrby E, Orvell C, Mufson MA** (1988) Respiratory syncytial virus: heterogeneity of subgroup B strains. *J. gen. Virol.* 69: 2145-2154
- Akerlind-Stopner B, Utter G, Mufson MA, Örvell C, Lerner RA, Norrby E** (1990) A subgroup-specific antigenic site in the G protein of respiratory syncytial virus forms a disulfide-bonded loop. *Journal of Virology*, 64(10): 5143-5148
- Alkhatib G, Roder J, Richardson C, Briedis D, Weinberg R, Smith D, Taylor J, Paoletti E, Shen S-H** (1994) Characterization of cleavage mutant of the measles virus fusion protein defective in syncytium formation. *Journal of Virology*, 68(10): 6770-6774
- Anderson K, Stott EJ, Wertz GW** (1992) Intracellular processing of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: amino acid substitutions affecting folding, transport and cleavage. *J. Gen. Virol.*, 73: 1177-88
- Anderson K, Stott EJ, Wertz GW** (1992) Intracellular processing of the human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein: amino acid substitutions affecting folding, transport and cleavage. *J. gen. Virol.*, 73: 1177-1188
- Anderson LJ, Bingham P, Hierholzer** (1988) Neutralization of respiratory syncytial virus by individual and mixtures of F and G protein monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, 62(11): 4232-4238
- Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, McIntosh K** (1985) Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *The Journal of Infectious Diseases*, 151(4): 626-633
- Arbiza J, Taylor G, Lopez JA, Furze J, Wyld S, Whyte P, Stott EJ, Wertz G, Sullender W, Trudel M, et. al** (1992) Characterization of two antigenic sites recognized by neutralizing monoclonal antibodies directed against the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 73: 2225-34
- Arumugham RG, Hildreth SW, Paradisio PR** (1989) Evidence that the fusion protein of respiratory syncytial virus exists as a dimer in its native form. *Arch. Virol.*, 106: 327-334
- Baker JC, Wilson EG, McKay GL, Stanek RJ, Underwood WJ, Velicer LF, Mufson MA** (1992) Identification of subgroups of bovine respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.*, 30(5): 1120-6
- Barik S** (1993) The structure of the 5' terminal cap of the respiratory syncytial virus mRNA. *J. Gen. Virol.*, 74: 485-90.
- Baybutt HN, Pringle CR** (1987) Molecular cloning and sequencing of the F and 22K membrane protein genes of the RSS-2 strain of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 68: 2789-2796

- Beeler JA, van Wyke Coelingh K** (1989) Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *Journal of Virology*, 63: 2941-2950
- Brugère-Picoux J, Hérout C** (1985) Le virus syncytial bovin. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, 69(1): 31
- Cane PA, Matthews DA, CR Pringle** (1991) Identification of variable domains of the attachment (G) protein of subgroup A respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.*, 72: 2091-2096.
- Cane PA, Thomas HM, Simpson AF, Evans JE, Hart CA, Pringle CR** (1996) Analysis of the human serological immune response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus during primary infection. *Journal of Medical Virology*, 48: 253-261
- Cody Meissner H** (1994) Economic impact of viral respiratory disease in children. *The Journal of Pediatrics*, 124(5): S17
- Collins PL, Dickens LE, buckler-white A, Olmsted RA, Spriggs MK, Camargo E, Coelingh K VW** (1986) Nucleotide sequences for the gene junctions of human respiratory syncytial virus reveal distinctive features of intergenic structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 4594-4598
- Collins PL, G Mottet** (1991) Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 72: 3095-3101.
- Collins PL, Hill MG, Camargo E, Grosfeld H, Chanock RM, Murphy BR** (1995) Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5'proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. *Medical Sciences*, 92: 11563-11567
- Collins PL, Hill MG, PR Johnson** (1990) The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression *in vitro*. *J. Gen. Virol.*, 71: 3015-3020.
- Collins PL, Huang YT, wertz GW** (1984) Identification of tenth mRNA of respiratory syncytial virus and assignment of polypeptides to the 10 viral genes. *journal of Virology*, 49: 572-578
- Collins PL, Mink MA, DS Stec** (1991) Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of a foreign reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88(21): 9663-9667.
- Collins PL, Mink MA, Stec DS** (1991) Rescue of synthetic analogs of respiratory syncytial virus genomic RNA and effect of truncations and mutations on the expression of foreign reporter gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(21): 9663-9667
- Collins PL, Mottet G** (1991) Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology*, 72: 3095-3101

- Connors M, Collins PL, Firestone CY, BR Murphy** (1991) Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J. Virol.*, 65(3): 1634-1637.
- Connors M, Collins PL, Firestone CY, Sotnikov AV, Waitze A, Davis AR, Hung PP, Chanock RM, Murphy BR** (1992) Cotton rats previously immunized with a chimeric RSV FG glycoprotein develop enhanced pulmonary pathology when infected with RSV, a phenomenon not encountered following immunization with vaccinia-RSV recombinants or RSV. *Vaccine*, 10(7): 475-84
- Dickens LE, Collins PL, Wertz GW** (1984) Transcriptional mapping of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 52: 364-369
- Doherty PC** (1994) Vaccines and cytokine-mediated pathology in RSV infection. *Trends. Microbiol.*, 2(5): 148-9, discussion 149-50
- Elango N, Prince GA, Murphy BR, Venkatesan S, Chanock RM, Moss B** (1986) Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 1906-1910
- Everard MI, Milner AD** (1992) the respiratory syncytial virus and its role in acute bronchiolitis. *Eur. J. Pediatr.*, 151: 639-651
- Furze J, Wertz G, Lerch R, Taylor G** (1994) Antigenic heterogeneity of the attachment protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 75: 363-70
- Garcia O, Martin M, Dopazo J, Arbiza J, Frabasile S, Russi J, Hortal M, Perez-Brena P, Martinez I, Garcia-barreno B** (1994) Evolutionary pattern of human respiratory syncytial virus (subgroup A): cocirculating lineages and correlation of genetic and antigenetic changes in the G glycoprotein. *J. Virol.*, 68(9): 5448-5459
- Garcia-Barreno B, Delgado T, Melero JA** (1994) Oligo(A) sequences of human respiratory syncytial virus G protein gene: assessment of their genetic stability in frameshift mutants. *J. Virol.* 1994 Sep, 68(9): 5460-8
- Garcia-Barreno B, Palomo C, Penas C, Delgado T, Perez-Brena P, Melero J** (1989) Marked differences in the antigenic structure of human respiratory syncytial virus F and G glycoproteins. *Journal of Virology*, 63(2)
- Gimenez HB, hardman N, Keir HM, Cash P** (1986) Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. *J. gen. Virol.*, 67: 863-870
- Groothuis JR, Levin MJ, Rodriguez W, Hall CB, Long CE, Kim HW, Lauer BA, VG Hemming** (1991) Use of intravenous gamma globulin to passively immunize high-risk children against respiratory syncytial virus: safety and pharmacokinetics. The RSVIG Study Group. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 35(7): 1469-1473.

- Grosfeld H, Hill MG, Collins PL** (1995) RNA replication by respiratory syncytial virus (RSV) is directed by the N, P, and L proteins; transcription also occurs under these conditions but requires RSV superinfection for efficient synthesis of full-length mRNA. *Journal of Virology*, 69(9): 5677-5686
- Hall CB, Walsh EE, Schnabel KC, Long CE, McConnochie KM, Hildreth SW, LJ Anderson** (1990) Occurrence of groups A and B of respiratory syncytial virus over 15 years: associated epidemiologic and clinical characteristics in hospitalized and ambulatory children. *J. Infect. Dis.*, 162(6): 1283-1290.
- Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG, Gustafson E, Bernstein JM, Galinski MS** (1994) Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology*, 200(2): 801-5
- Hemming VG, Rodriguez W, Kim HW, Brandt CD, Parrot RH, Burch B, Prince GA, baron PA, Fink RJ, Reaman G** (1987) Intravenous immunoglobulin treatment of respiratory syncytial virus infection in infants and young children. *Antimicrobial agents nad chemotherapy*, 31: 1882-1886
- Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson LJ, Fernie BF, McIntosh K** (1986) Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *Journal of Infectious Disease*, 153: 291-297
- Hierholzer JC, Tannock GA, Hierholzer CM, Coombs RA, Kennett ML, Phillips PA, Gust ID** (1994) Subgrouping of respiratory syncytial virus strains from Australia and Papua New Guinea by biological and antigenic characteristics. *Arch. Virol.*, 136(1-2): 133-47
- Huang YT, Wertz GW** (1982) The genome of respiratory syncytial virus is negative strand RNA that codes for at least seven mRNA species. *Journal of Virology*, 43: 150-157
- Inaba Y, Tanaka Y, Omori T, Matumoto M** (1970) Isolation of bovine respiratory syncytial virus. *Jpn. J. Exp. Med.*, 40: 473
- Inaba Y, Tanaka Y, Sato K, Ito H, Omori T, Matumoto M** (1970) Nomi virus, a virus isolated from apparently new epizootic respiratory syncytial disease of cattle. *Japanese Journal of Microbiology*, 14: 246-248
- Johnson PR, Olmsted RA, Prince GA, Murphy BR, Alling DW, Walsh EE, Collins PL** (1987) Antigenic relatdeness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins. *Journal of Virology*, 61(10): 3163-3166
- Johson PR, Collins PL** (1989) The 1B (NS2), 1C (NS1) and N proteins of human respiratory syncytial virus (RSV) of antigenic subgroups A and B: sequence conservation and divergence within RSV genomic RNA. *J. gen. Virol.*, 71: 481-485

- Kennedy HE, Jones BV, Tucker EM, Ford NJ, Clarke SW, Furze J, Thomas LH, Stott EJ** (1988) Production and characterization of bovine monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 69: 3023-3032
- Kennedy HE, Jones BV, Tucker EM, Ford NJ, Clarke SW, Furze J, Thomas LH, Stott EJ** (1988) Production nad characterization of bovine monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 69: 3023-3032
- Kimman TG, Westenbrink F** (1990) Immunity to human and bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.*, 112:1-25
- Lambden PR** (1985) Nucleotide sequence of the respiratory syncytial virus phosphoprotein gene. *J. gen. Virol.*, 66: 1607-1612
- Lambert D** (1988) Role of oligosaccharides in the structure and function of respiratory syncytial virus glycoproteins. *Virology*, 164: 458-466
- Langedijk JPM, Middel WGJ, Schaaper WMM, Meloen RH, Kramps JA, Brandenburg AH, Oirschot JT** (1996) Type-specific serologic diagnosis of respiratory syncytial virus infection, based on a synthetic peptide of the attachment protein G. in press. b
- Langedijk JPM, Schaaper WMM, Meloen RH, van Oischot JT** (1996) Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. in press. a
- Lerch RA, Anderson K, GW Wertz** (1990) Nucleotide sequence analysis and expression from recombinant vectors demonstrate that the attachment protein G of bovine respiratory syncytial virus is distinct from that of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, 64(11): 5559-5569.
- Levine S, Klaiber-Franco R, Paradisio PR** (1987) Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 68: 2521-2554
- Lewis FA, Rae ML, Lehman NI, Ferris AA** (1961) A syncytial virus associated with epidemic disease of the lower respiratory tract in infants and young children. *Medical Journal of Australia*, 48: 932-933
- Lichtenstein DL, Roberts SR, Wertz GW, Ball LA** (1996) Definition and functional analysis of the signal/anchor domain of the human respiratory syncytial virus glycoprotein G. *J. gen/ Virol.*, 77: 109-118.
- Lopez JA Villanueva N, Melero JA, Portela A** (1988) Nucleotide sequence of the fusion and phosphorylation genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype genetic heterogeneity. *Virus Research*, 10: 249-262
- Lopez JA, Andreu D, Carreno C, Whyte P, Taylor G, Melero JA** (1993) Conformational constraints of conserved neutralizing epitopes from a major antigenic area of human respiratory syncytial virus fusion glycoprotein. *J. Gen. Virol.*, 74: 2567-77

- Lopez JA, Villanueva N, Melero JA, Portella A** (1988) Nucleotide sequence of the fusion and phosphorylation genes of human respiratory syncytial (RS) virus Long strain: evidence of subtype heterogeneity. *Virus Research*, 10: 249-262
- Lounsbach GR, Bourgeois C, West WH, Robinson JW, Carter MJ, Toms GL** (1993) Binding of neutralizing monoclonal antibodies to regions of the fusion protein of respiratory syncytial virus expressed in *Escherichia coli*. *J. Gen. Virol.*, 74: 2559-65
- Mallipeddi SK, Samal SK** (1993) Sequence variability of the glycoprotein gene of bovine respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 74: 2001-4.
- Martin-Gallardo A, Fien KA, Hu BT, Farley JF, Seid R, Collins PL, Hildreth SW, PR Paradiso** (1991) Expression of the F glycoprotein gene from human respiratory syncytial virus in *Escherichia coli*: mapping of a fusion inhibiting epitope. *Virology*, 184(1): 428-432.
- Martin-Gallardo A, Fleischer E, Doyle SA, Arumugham R, Collins PL, Hildreth SW, Paradiso PR** (1993) Expression of the G glycoprotein gene of human respiratory syncytial virus in *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Virol.*, 74: 453-8.
- Matheise JP, Walravens K, Collard A, Coppe P, Letesson JJ** (1995) Antigenic analysis of the F protein of the bovine respiratory syncytial virus: identification of two distinct antigenic sites involved in fusion inhibition., *Arch. Virol.*, 140(6): 993-1005
- Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop DHL** (1987) Baculovirus expression vectors: the requirements for high level expression of proteins, including glycoproteins. *Journal of General Virology*, 68: 1233-1250
- McIntosh K, Chanock RM** (1990) Respiratory syncytial virus. Raven press, New York.
- McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O** (1993) Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin. Infect. Dis.*, 16(1): 151-64.
- Morgan LA, Routledge EG, Willcocks MM, Samson ACR, Scott R, Toms GL** (1987) Strain variation of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 68: 2781-2788
- Moulard M, Bahraoui E** (1995) Rôle de la maturation protéolytique des glycoprotéines d'enveloppe virale. *Medecine Sciences*, 11: 73-80
- Mufson M, Örvell C, Rafnar B, Norrby E** (1985) Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 66: 2111-2124
- Mufson MA, Akerlind Stopner B, Orvell C, Belshe RB, Norrby E** (1991) A single-season epidemic with respiratory syncytial virus subgroup B2 during 10 epidemic years, 1978 to 1988. *J. Clin. Microbiol.*, 29(1): 162-5
- Mulkey KM, GA Anderson** (1991) Monoclonal antibodies to the fusion protein of bovine respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol.*, 29(9): 2038-2040.
- Murphy BR, Paradiso PR, hildreth S, Hocjmeyer WT, Jensen AB, Sotnikov A, Lawrence L, Zubak JJ, Chanock RM, Prince GA** (1989) Immunization of cotton rats with the fusion (F) and

large (G) glycoproteins of respiratory, syncytial virus (RSV) protects against RSV challenge without potentiating RSV disease. *Vaccine*, 7: 533-540

Murphy BR, Sotnikov A, Pradiso PR, Hildreth SW, Jenson AB, Baggs RB, Lawrence L, Zubak JJ, Chanock RM, Beeler JA, Prince GA (1989) Immunization of cotton rats with the fusion (F) and large (G) glycoproteins of respiratory syncytial virus (RSV) protects against RSV challenge without potentiating RSV disease. *Vaccine*, 7: 533-540

Murphy BR, Sotnikov AV, Lawrence LA, Banks SM, GA Prince (1990) Enhanced pulmonary histopathology is observed in cotton rats immunized with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) or purified F glycoprotein and challenged with RSV 3-6 months after immunization. *Vaccine*, 8(5): 497-502.

Murphy FA, Fauquet CM, Bishop DHL, Ghabrial SA, Jarvis AW, Martelli GP, Mayo MA, Summers MD (1995) Virus taxonomy. Paromyxoviridae, 266-274

Norrby E, Mufson MA, Alexander H, Houghten RA, Lerner RA (1987) Site-directed serology with synthetic peptides representing the large glycoprotein G respiratory virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 6572-6576

Norrby E, Mufson MA, Sheshberadaran H (1986) Structural differences between subtype A and B strains of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 67: 2721-2729

Olmsted RA, Elango N, Prince GA, Murphy BR, Johnson PR, Moss B, Chanock RM, Collins PL (1986) Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus: comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7462-7466

Olmsted RA, Murphy BR, Lawrence LA, Elango N, Moss B, Collins PL (1989) Processing, surface expression, and immunogenicity of carboxy-terminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 63(1): 411-420

Openshaw PJM (1995) Immunopathological mechanisms in respiratory syncytial virus disease. *Springer Semin. Immunopathol.*, 17:187-201

Orvell C, Norrby E, Mufson MA (1987) Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J. gen. Virol.*, 68: 3125-3135

Örvell C, Norrby E, Mufson MA (1987) Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against five structural components of human respiratory syncytial virus subgroup B. *J. gen. Virol.*, 68: 3125-3135

Paccaud MF, Jacquier CL (1970) A respiratory syncytial virus of bovine origin. *Archiv für die gesamte Virusforschung*, 30: 327-342

- Palomo C, Garcia-Barreno B, Penas C, JA Melero** (1991) The G protein of human respiratory syncytial virus: significance of carbohydrate side-chains and the C-terminal end to its antigenicity. *J. Gen. Virol.*, 72: 669-675.
- Panuska JR, Hertz MI, Taraf H, Villani A, Cirino NM** (1992) Respiratory syncytial virus infection of alveolar macrophages in adult transplant patients. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 145: 934-9
- Paradiso PR, Hu BT, Arumugham R, S Hildreth** (1991) Mapping of a fusion related epitope of the respiratory syncytial virus fusion protein. *Vaccine*, 9(4): 231-237.
- Prozzi D, walravens K, Langedijk JPM, Daus F, Kramps JA, Letesson J-J** (1996) Antigenic and molecular analysis of the variability of bovine respiratory syncytial virus G glycoprotein. *J. gen. Virol.*, in press
- Roberts SR, Lichtenstein D, Ball LA, Wertz GW** (1994) The membrane-associated and secreted forms of the respiratory syncytial virus attachment glycoprotein G are synthesized from alternative initiation codons. *J. Virol.*, 68(7): 4538-46
- Robinson BS, Everson JS** (1995) Epitopes specificities of human serum antibodies reactive with respiratory syncytial virus fusiojn protein. *J. Gen. Virol.*: 125: 273-286
- Routledge EG, Willcocks MM, Morgan L, Samson ACR, Scott R, Toms GL** (1988) The purification of four respiratory syncytial virus proteins and their evaluation as protective agents against experimental infection in BALB/c mice. *J. gen. Virol.*, 69: 293-303
- Rueda P, Delgado T, Portela A, Melero JA, B Garcia-Barreno** (1991) Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses resistant to neutralization by monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 65(6): 3374-3378.
- Rueda P, Garcia-Barreno B, Melero JA** (1994) Loss of conserved cysteine residues in the attachment (G) glycoprotein of two human respiratory syncytial virus escape mutants that contain multiple A-G substitutions (hypermutations). *Virology*, 198(2): 653-62
- Rueda P, Palomo C, Garcia-Barreno B, Melero JA** (1995) The three C-terminal residues of human respiratory syncytial virus G glycoprotein (long strain) are essential for integrity of multiple epitopes distinguishable by antiidiotypic antibodies. *Viral Immunology*, 8(1): 37-46
- Schrivier RS, Daus F, Kramps JA, Langedijk JPM, Buijs R, Middel WGJ, Taylor G, Furze J, Huyben MWC, van Oirschot JT** (1996) Subgrouping of bovine respiratory syncytial virus strains detected in lung tissue. in press
- Sharma R, Woldehiwet Z** (1990) Pathogenesis of bovine respiratory syncytial virus in experimental infected lambs. *veterinary Microbiology*, 23: 267-272
- Siber GR, Leszczynski J, Pena-Cruz V, Ferren Gardner C, Anderson R, Hemming VG, Walsh EE, Burns J, McIntosh K, Gonin R** (1992) Protective activity of a human respiratory syncytial virus immune globulin prepared from donors screened by microneutralization assay. *J. Infect. Dis.*, 165(3): 456-63

- Stott EJ, Ball LA, Anderson K, Young K, Huang AMQ, Wertz GW** (1987) Immune and histopathological responses in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express individual genes of human respiratory syncytial virus. *J. Virol.*, 61: 3855-3861
- Stott EJ, Ball LA, Young KY, Furze J, Wertz GW** (1986) Human respiratory syncytial virus glycoprotein G expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects mice against live-virus challenge. *J. Virol.*, 60: 607-613
- Stott EJ, Taylor G** (1985) Respiratory syncytial virus. *Archives of Virology*, 84: 1-52
- Sullender W** (1995) Antigenic analysis of chimeric and truncated G proteins of respiratory syncytial virus. *Virology*, 209(1): 70-9
- Sullender WM, Anderson LJ, Anderson K, GW Wertz** (1990) Differentiation of respiratory syncytial virus subgroups with cDNA probes in a nucleic acid hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.*, 28(8): 1683-1687.
- Sullender WM, Mufson MA, Anderson LJ, GW Wertz** (1991) Genetic diversity of the attachment protein of subgroup B respiratory syncytial viruses. *J. Virol.*, 65(10): 5425-5434.
- Taylor G, Stott EJ, Bew M, Fernie BF, Cote PJ, Collins AP, Jebbett J** (1984) Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology*, 52: 137
- Taylor G, Stott EJ, Furze J, Ford J, P Sopp P** (1992) Protective epitopes on the fusion protein of respiratory syncytial virus recognized by murine and bovine monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.*, 73: 2217-23
- Trudel M, Nadon F, Seguin C, H Binz** (1991) Protection of BALB/c mice from respiratory syncytial virus infection by immunization with a synthetic peptide derived from the G glycoprotein. *Virology*, 185(2): 749-757.
- Trudel M, Nadon F, Simard C, Bélanger F, Alain R, Séguin C, Lussier G** (1989) Comparison of caprine, human and bovine strains of respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.*, 107: 141-149.
- Trudel M, Stott EJ, Taylor G, Oth D, Mercier G, Nadon F, Seguin C, Simard C, M Lacroix** (1991) Synthetic peptides corresponding to the F protein of RSV stimulate murine B and T cells but fail to confer protection. *Arch. Virol.*, 117(1-2): 59-71.
- Verhoeff J, Dijk M, Dijkhuizen AA** (1989) Proceeding of the second meeting of the association of epidemiology and economy ("vereniging voor epidemiologie en economie") Utrecht
- Walpita P, Mufson MA, Stanek RJ, Pfeifer D, Connor JD** (1992) Distinguishing between respiratory syncytial virus subgroups by protein profile analysis. *J. Clin. Microbiol.*, 30(4): 1030-2
- Walravens K, Kettmann R, Collard A, Coppe P, A Burny** (1990) Sequence comparison between the fusion protein of human and bovine respiratory syncytial viruses. *J. Gen. Virol.*, 71: 3009-3014.

- Walravens K, Matheise JP, Didembourg C, Coppe P, Collard A, Knott I, Kettmann R, Letesson JJ** (in press) Immunogenic and protective properties of bovine respiratory syncytial virus fusion glycoprotein expressed in recombinant baculovirus infected insect cells. *Arch. Virol.*
- Walsh EE, Brandriss MW, Schlesinger JJ** (1985) Purification and characterization of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J. gen. Virol.*, 66: 409-415
- Walsh EE, Cote PJ, Fernie BF, Schlesinger JJ, Brandriss MW** (1986) Analysis of the respiratory syncytial virus fusion protein using monoclonal and polyclonal antibodies. *J. gen. Virol.*, 67: 505-513
- Walsh EE, Hall CB, Briselli M, Brandriss MW, Schlesinger JJ** (1987) Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. *J. Infect. Dis.*, 155: 1198-1204
- Walsh EE, Hall CB, Briselli MW, Brandriss MW, Schlesinger JJ** (1987) Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. *J. Infect. Dis.*, 155: 1198-1204
- Walsh EE, Schlesinger JJ, Brandriss MW** (1984) Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *J. gen. Virol.*, 65: 761-767
- Wang C, Raghu G, Morrison T, Peebles ME** (1992) Intracellular processing of the paramyxovirus F protein: critical role of the predicted amphipatic alpha helix adjacent to the fusion domain. *J. Virol.*, 66(7): 4161-4169
- Ward KA, Lambden PR, Ogilvie MM, Watt PJ** (1983) Antibodies to respiratory syncytial virus polypeptides and their significance in human infection. *Journal of General Virology*, 64: 1867-1876
- Wellems G, Leunen J** (1975) Le virus respiratoire syncytial et les troubles respiratoires des bovins. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 119: 359-369
- Wertz GW, Collins PL, Huang Y, Gruber C, Levine S, Ball LA** (1985) Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4075-4079
- Wertz GW, Krieger M, Ball LA** (1989) Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *Journal of Virology*, 63(11): 4767-4776
- Wertz GW, Stott EJ, Young KKY, Anderson, K, Ball LA** (1987) Expression of the fusion protein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. *Journal of Virology*, 61: 4767-4776
- Westenbrink F, Kimman TG, JM Brinkhof** (1989) Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves. *J. Gen. Virol.*: 70: 591-601.

Yu Q, Hardy RW, Wertz GW (1995) Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. *J. Virol.*, 69(4): 2412-9