

ETUDE DE L'ANTIGENICITE DE LA PROTEINE CA P27 DES RETROVIRUS AVIAIRES : INTERET DANS LA CONCEPTION DE NOUVEAUX OUTILS DE DIAGNOSTIC

Guyonnet Franck^{1*}, Minta Zénon², Lasserre Frédéric¹, Lescure Florence¹, Baudon Pascale¹,
Grosclaude Jeanne³, Barin Francis⁴, Goudeau Alain⁴, Dambrine Ginette¹

1 Virologie et Oncologie Aviaire, PAP, INRA, 37380 Nouzilly, France

2 Institut Vétérinaire, Al. Partyzantow 57, 24100 Pulawy, Pologne

3 Virologie et Immunologie Moléculaires, INRA, 78352 Jouy-en-Josas, France

4 Virologie, URA CNRS 1334, CHU Bretonneau, 37044 Tours, France

Résumé

La protéine de capsid CA p27 des rétrovirus aviaires est le support immunogène essentiel de ces virus et la réponse immunitaire dirigée contre cette protéine virale joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection virale. C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de l'antigénicité de cette protéine et l'établissement de sa carte épitopique. A cet effet plusieurs stratégies complémentaires ont été mises en oeuvre. Nous avons produit des anticorps monoclonaux contre cette protéine et nous avons analysé leur spécificité par des tests immunoenzymatiques utilisant différentes souches virales. La plupart des anticorps reconnaissent l'ensemble des souches utilisées ; deux groupes présentent des spécificités restreintes et peuvent être judicieusement utilisés pour améliorer les tests de détection des virus appliqués à l'heure actuelle. La cartographie épitopique de la protéine CA p27 a été effectuée par l'étude des interactions antigène-anticorps mesurée par résonance plasmonique de surface avec le système BIAcore. Cette étude a permis de déterminer l'existence d'au moins huit épitopes distincts sur la protéine CA p27. Une approche complémentaire a été effectuée à l'aide de peptides synthétiques mimant deux régions de l'extrémité C terminale de la protéine CA p27 qui se sont révélées fortement antigéniques. L'ensemble de ces résultats devrait aboutir à la conception de nouveaux tests sérologiques hautement rapides et fiables et présentant de meilleures performances que les tests actuellement disponibles.

Introduction

L'infection par les rétrovirus aviaires est un phénomène fréquent qui peut entraîner des baisses de performances zootechniques (Gavora et al., 1980) préjudiciables à la rentabilité des élevages avicoles ou être à l'origine du développement de néoplasies (Revue de Payne et Purchase, 1991). L'observation au cours de ces dernières années de plusieurs cas de myélocytomatose, provoqués par un nouveau rétrovirus aviaire (Payne et al., 1991a, b), entraînant dans les troupeaux de production des taux de mortalité pouvant atteindre 60%, obligent à poursuivre les efforts visant à l'éradication de ces virus. Dans ce contexte, la mise au point de nouveaux outils de diagnostic constitue un facteur de progrès.

La connaissance de l'antigénicité de la protéine de capsid CA p27 de ces virus doit permettre de parvenir à cet objectif. En effet, la protéine CA p27 qui est le composant majeur de la capsid virale porte la majorité des déterminants antigéniques de groupe (Bolognesi et al., 1975 ; Guyonnet, 1993) et sa révélation permet de démontrer la présence d'un rétrovirus aviaire, indépendamment de son sous-groupe. De plus, la protéine CA p27 est fortement immunogène (Smith, 1977) et elle est produite en grande quantité dans les fluides biologiques des

poules infectées (Clark et Dougherty, 1980 ; Crittenden et Smith, 1984). La protéine CA p27 est responsable de l'induction de réponses immunitaires contrôlant le développement de l'infection virale.

L'expression de virus endogènes qui préexistent sous forme d'une copie d'ADN dans le patrimoine des poules saines non infectées peut conduire à la production d'une protéine CA p27 endogène. L'expression de cette protéine pourrait être à l'origine d'un phénomène de tolérance, favorisant l'infection par un virus exogène et facilitant ainsi le développement des pathologies associées.

Les connaissances relatives à l'antigénicité et à l'immunogénicité de la protéine CA p27 étaient paradoxalement très fragmentaires et c'est pourquoi nous avons mis en oeuvre différentes stratégies complémentaires pour caractériser les épitopes de la protéine CA p27 des rétrovirus aviaires.

Isolement d'une collection d'anticorps monoclonaux (AcMn) spécifiques de la protéine CA p27 exogène

Des souris BALB/C ont été immunisées par des injections répétées de protéine CA p27 purifiée par électrophorèse préparative à partir d'une souche de rétrovirus aviaire exogène que l'on peut aisément

produire en quantité importante. la souche de virus AMV (Avian Myeloblastosis Virus)-MAV (Myeloblastosis Associated Virus) de sous-groupe B. Quatre expériences indépendantes de fusions cellulaires ont été effectuées entre les splénocytes de souris immunes et le myélome X-63-Ag-653. Une collection de 320 hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre la protéine CA p27 d'AMV (MAV)B a été obtenue.

Caractérisation des AcMn par dosages immunoenzymatiques

Afin de préciser la spécificité de reconnaissance des AcMn isolés, différentes souches de rétrovirus aviaires appartenant à plusieurs sous-groupes de virus exogène ainsi que la souche prototype de virus endogène RAVO ont été utilisées à titre d'antigène dans des dosages immunoenzymatiques de type ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Les souches AMV(MAV)B, RSV (Rous sarcoma virus)-Prague B, RAV (Rous associated virus)-1 de sous-groupe A et la souche RSV-Schmidt Rupp D ont été testées à titre de virus exogène.

La plupart des AcMn réagissent avec les différentes souches virales utilisées dans les tests ELISA ; l'intensité des réactions observées est très variable d'un AcMn à l'autre, suggérant l'existence de plusieurs épitopes sur la protéine CA p27. L'un des AcMn reconnaît uniquement la protéine CA p27 de la souche virale ayant servi à immuniser les souris ; il définit ainsi une spécificité de souche sur la protéine de capsid CA p27 qui n'avait jamais été décrite auparavant. Neuf AcMn réagissent exclusivement avec les souches virales des sous-groupes exogènes et pourraient être utilisés pour discriminer les formes exogène et endogène de la protéine CA p27 des rétrovirus aviaires.

Cartographie épitopique de la protéine CA p27 par l'utilisation du système BIAcore

Des AcMn représentatifs de la collection isolée ont été utilisés pour déterminer s'ils reconnaissent des épitopes topographiquement identiques ou différents.

Le système BIAcore est aujourd'hui le système le plus performant, utilisable dans ce domaine (Jönsson et al., 1991). Il permet en effet de quantifier des interactions moléculaires, en temps réel, par la mesure d'un phénomène plasmonique de surface. L'appareil est muni de trois éléments : un biocapteur, une microplaquette fluidique et une unité optique.

L'un des réactifs (ex. protéine CA p27) est immobilisé par liaison covalente sur une couche de dextran fixée sur le biocapteur. L'autre réactif (ex : AcMn dirigé contre la protéine CA p27) est introduit par le système microfluidique dans une solution qui

s'écoule en continu à la surface du biocapteur. La liaison entre les deux molécules entraîne une modification de l'indice de réfraction du milieu présent à la surface du biocapteur et la conception de l'appareil permet l'enregistrement d'un phénomène de résonance plasmonique de surface (exprimé en Unités de Résonance).

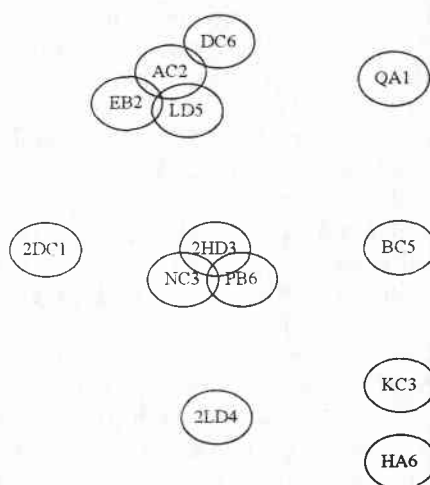
Un signal de 1000 Unités de Résonance (UR) correspond approximativement à un changement de concentration de surface de 1 ng/mm² et traduit ainsi la liaison éventuelle de la molécule en solution avec le ligand immobilisé.

Deux stratégies différentes ont été mises en oeuvre pour établir la topographie épitopique de la protéine CA p27.

Nous avons utilisé, dans une première étude, le biocapteur fourni par le fabricant qui reconnaît les AcMn de souris, quelle que soit leur spécificité. L'étape limitante de cette stratégie pour l'établissement d'une carte épitopique réside dans les capacités de capture de l'antigène par les AcMn obtenus. Dans notre cas, l'AcMn DC1 interagissant avec le biocapteur s'est avéré capable de se lier de manière stable avec la protéine CA p27 présente dans le milieu fluide.

Dans une deuxième approche, nous avons immobilisé la protéine CA p27 sur le biocapteur, de manière covalente, par l'intermédiaire des groupements amine.

FIGURE I : Topographie des épitopes reconnus par les AcMn dirigés contre la protéine CA p27



L'injection des AcMn a ensuite été effectuée afin de quantifier les interactions des différents AcMn avec la protéine CA p27 captée par l'AcMn DC1 ou immobilisée sur le biocapteur. L'amplitude de ces

interactions se traduit par un signal exprimé en unités de résonance.

Des injections séquentielles d'AcMn ont été réalisées afin d'établir les relations existant entre les différents épitopes reconnus par les AcMn. Des phénomènes d'additivité (augmentation du signal de résonance) ou au contraire d'inhibition de liaison ont été observés. L'additivité traduit une indépendance des épitopes reconnus par les AcMn utilisés alors que l'inhibition révèle l'existence d'une relation entre ces épitopes.

L'ensemble des résultats obtenus par les deux stratégies a permis de mettre en évidence l'existence de huit épitopes indépendants. Parmi ceux-ci, deux groupes d'AcMn semblent définir deux familles d'épitopes apparentés (Fig. I).

Synthèse d'oligopeptides mimant des régions de la protéine CA p27 potentiellement immunogènes

La synthèse d'oligopeptides (Van Regenmortel et al., 1988) constitue une stratégie complémentaire aux investigations précédentes pour définir les régions de la protéine CA p27 responsables de l'induction de réaction immunitaires.

L'analyse de la réactivité des AcMn vis à vis de fragments peptidiques de la protéine CA p27 résultant de clivage chimique avait montré que la plupart d'entre eux étaient dirigés contre l'extrémité C terminale de la protéine (Guyonnet, 1993). L'identification des fragments reconnus par ces anticorps et l'application de programmes de prédictions épitopiques avaient conduit à identifier une région située entre les résidus 206 et 230 comportant deux épitopes potentiels (Fig. II).

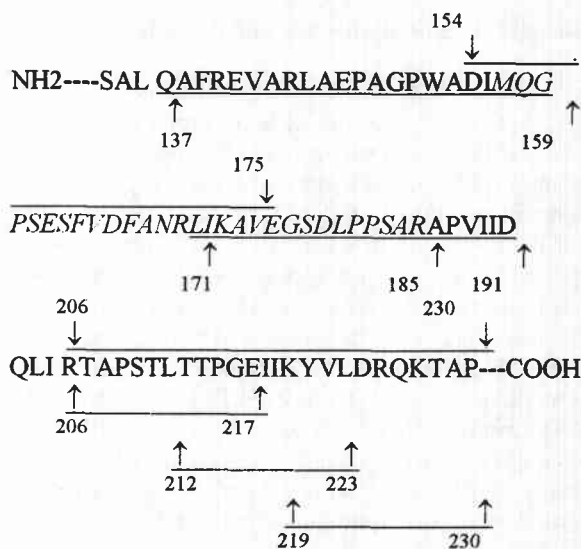
La deuxième région que nous avons choisi d'étudier s'étend des résidus 137 à 191 et comporte une séquence dénommée MHR (Major Homology Region) qui est très conservée dans toute la famille des rétrovirus, incluant aussi bien les virus leucosiques aviaires que les virus humains comme le virus HIV (Human immunodeficiency virus). Cette région semble jouer un rôle majeur dans la maturation des virions chez les rétrovirus aviaires (Craven et al., 1995) et les sérums de sujets humains infectés par le virus HIV réagissent contre des peptides correspondant à cette région. D'où l'intérêt d'entreprendre son étude dans le cas des rétrovirus aviaires.

FIGURE II : Régions de la protéine CA p27 utilisées pour la synthèse d'oligopeptides.

- Région 137-191 : -synthèse de 3 peptides chevauchants : séquences correspondantes soulignées.

- Région 157-185 = MHR (Major Homology Region), italique.

- Région 206-230 : - synthèse de 3 peptides chevauchants ainsi que d'un peptide correspondant à la séquence complète.



Des oligopeptides chevauchants ont été synthétisés pour ces deux régions et la réactivité de sérums de poulets immunisés contre la protéine CA p27 ou expérimentalement infectés par les rétrovirus aviaires a été recherchée par des tests ELISA. La spécificité des réactions observées a été vérifiée par un test ELISA de compétition en milieu liquide (Baillou et al., 1993). Les résultats obtenus montrent que chacune des deux régions analysées comporte des peptides reconnus par de tels sérums. Ces peptides représentent donc des épitopes séquentiels de la protéine CA p27.

De plus, des injections répétées chez la poule du peptide 206-230 comportant une cystéine NH2 terminale conduit à la production d'anticorps spécifiques qui reconnaissent également la protéine CA p27. Cette observation révèle non seulement que ce peptide comporte des épitopes séquentiels mais également qu'il est immunogène sans nécessiter de couplage à une protéine porteuse. Les anticorps obtenus peuvent être mis en évidence dans le sérum des poules immunisées et leur purification à partir du jaune d'oeuf est également réalisable (Tableau I).

TABEAU I Reconnaissance de la protéine CA p27 par les anticorps dirigés contre le peptide 206-230

Dilution	Absorbance			
	Sérum de poule		IgY purifiées à partir des jaunes d'oeufs	
	preimmun	immun	non spécifiques	spécifiques
1/100	0.15	0.96	0.0	1.25
1/1000	0.12	0.42	0.0	1.27

Conception de nouveaux tests de diagnostic

L'isolement d'AcMn reconnaissant exclusivement la protéine CA p27 exogène nous a permis d'envisager la conception de tests de détection des rétrovirus aviaires plus spécifiques que le test ELISA couramment utilisé. Celui-ci est en effet un test ELISA de type sandwich dans lequel la phase solide est sensibilisée par un sérum polyclonal de lapin dirigé contre la protéine CA p27 exogène qui sert également de conjugué, couplé à la peroxydase, pour révéler la présence de protéine CA p27 dans l'échantillon analysé. Ce test ELISA sandwich est facile à réaliser, rapide, sensible et il est utilisé dans les programmes d'éradication des virus leucosiques aviaires. Toutefois, il ne permet pas de distinguer la protéine CA p27 résultant d'une infection par un rétrovirus exogène et la protéine CA p27 provenant de l'expression d'une séquence endogène. Parmi les AcMn reconnaissant exclusivement la protéine CA p27 exogène, nous avons choisi de déterminer les caractéristiques précises des AcMn produits par l'hybridome le plus stable. La spécificité de reconnaissance de l'AcMn QA1 a ainsi été confirmée et nous avons poursuivi les essais afin de déterminer les conditions d'utilisation de cet AcMn dans un test ELISA sandwich. Plusieurs combinaisons d'AcMn, choisies en fonction des résultats fournis par la topographie épitopique obtenue par le système BIAcore ont été éprouvées afin de préserver la sensibilité du test tout en améliorant sa spécificité. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus avec des échantillons de troupeaux expérimentaux sont conformes à notre attente et nous avons entrepris des essais à plus grande échelle sur des troupeaux de production.

L'étude de la réactivité des oligopeptides de synthèse ouvre la voie à la conception de nouveaux tests de diagnostic utilisables en sérologie aviaire. En effet, la production de ces peptides est facile à réaliser, peu coûteuse ; l'utilisation de ces peptides dans des tests immuno-enzymatiques ne pose pas de problème majeur. A l'heure actuelle, on ne dispose pas de tests sérologiques pour la détection d'anticorps dirigés

contre la protéine CA p27 des rétrovirus aviaires. Seules des méthodes de séroneutralisation nécessitant la mise en oeuvre de cultures cellulaires sont envisageables. Celles-ci permettent de rechercher les anticorps spécifiques d'un groupe de virus donné mais ne conduisent pas à la mise en évidence d'une réponse sérologique de groupe. La conception d'un test reposant sur l'utilisation des peptides que nous avons étudiés serait un moyen de combler cette lacune.

Enfin, la production d'IgY de poules spécifiques du peptide 206-230, susceptibles d'être isolées pendant une période de 270 jours après la dernière immunisation, reconnaissant la protéine CA p27 constitue une alternative particulièrement judicieuse pour la production d'anticorps contre la protéine CA p27. L'utilisation de peptide 206-230 facile à synthétiser de manière strictement reproductible évite la purification fastidieuse et aléatoire de la protéine CA p27. C'est un exemple d'application complémentaire de l'intérêt des oligopeptides de synthèse qu'il convient de souligner.

Références

- Baillou A., Brand D., Denis F., Mboup S., Chout R., Goudau A., Barin F., 1993. AIDS research and human retroviruses, 9, 1203-1209.
- Bolognesi D.P., Ishizaki R., Huper G., Vanaman T.C., Smith R.E., 1975. Virology, 64, 349-357.
- Clark D.P., Dougherty R.M., 1980. J. Gen. Virol., 47, 283-291.
- Craven R.C., Leure-du-Pree A.E., Weldon R.A.Jr., Wills J.W., 1995. J. Virol., 69, 4213-4227.
- Crittenden L.B., Smith E.J., 1984. Avian Dis., 28, 1057-1070.
- Gavora J.S., Spencer J.L., Gowe R.S., Harris D.L., 1980. Poult. Sci., 59, 2165-2178.
- Guyonnet F., 1993. Thèse de l'Université François Rabelais, Tours, 283 pages.
- Jönsson U., Fägerstam L.G., Ivarsson B., and Johnsson B., 1991. BioTechniques, 11, 620-627.
- Payne L.N., Purchase H.G., 1991. In : Diseases of Poultry. (Calnek edit.), Wolfe Publishing Ltd, Ame Iowa, pp 386.
- Payne L.N., Brown S.R., Bumstead N., Howes K., Frazier J.A., Thouless M.E., 1991a. J. Gen. Virol., 72, 801-807.
- Payne L.N., Gillespie A.M., Howes K., 1991b. Vet. Rec., 129, 447-448.
- Smith E.J., 1977. Avian Dis., 21, 290-299.
- Van Regenmortel M.H.V., Briand J.P., Muller S., and Plaue S., 1988. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier, Amsterdam, 19 : 1.