

SÉBASTIEN GARIÉPY

**INTERACTION DE LA CAPSIDE DU PARVOVIRUS PORCIN
AVEC SON ENVIRONNEMENT**

Mémoire
présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation:

Serge Dea, INRS-Institut Armand-Frappier

Kenneth Dimock, Université d'Ottawa

Peter Tijssen, INRS-Institut Armand-Frappier

Juin 2000

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

À Edgar et André

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
SOMMAIRE	xiii
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
1. GÉNÉRALITÉS	5
1.1 Classification des parvovirus	5
1.2 Pathologie des parvovirus autonomes	5
1.3 Caractéristiques du virion	8
1.3.1 Propriétés du virion	8
1.3.2 Structure du virion	9
1.3.3 Propriétés biochimiques	11
1.3.4 Propriétés antigéniques	13
1.4 Structure du génome viral	14
1.4.1 Organisation et stratégie d'utilisation du génome viral	15
2. PARVOVIRUS PORCIN	15
2.1 Introduction	15
2.2 Aspects moléculaires	16
2.3 Organisation génomique	17
2.4 Souches du PPV	20
2.4.1 Pathogénie	20
2.5 Tropisme et spectre d'hôte	23
2.5.1 Cartographie des résidus importants	23
3. RÔLES ET IMPLICATIONS DE LA STRUCTURE DES PARVOVIRUS	26
3.1 Infection virale	26
3.1.1 Récepteurs des parvovirus	27
3.1.2 Récepteur et tropisme	28
3.1.3 Étapes précoces de l'infection	29

3.2 Rôles de la structure des parvovirus	29
3.2.1 Structure antigénique de la capside	30
3.2.2 Implication antigénique de la portion N-terminale des protéines structurales	31
3.3 Conclusion	32
4. PARTICULES VIRALES RECOMBINANTES VIDES (VLPs)	33
4.1 Définition	33
4.2 Systèmes d'expression	34
4.3 <i>Pichia pastoris</i>	36
5. BANQUES PEPTIDIQUES EXPOSÉES EN SURFACE DE PHAGES	37
5.1 Principes et méthodes	37
5.2 Applications	39
APPROCHE EXPÉRIMENTALE	40
1. CELLULES	41
1.1 Origine des cellules	41
1.2 Culture cellulaire	41
2. MATÉRIEL INFECTIEUX	41
2.1 Virus	41
2.2 Clones infectieux PPV	42
3. ANTICORPS MONOCLONAL ET POLYCLONAUX PORCINS	42
3.1 Hybridome 3C9-D11-H11	42
3.2 Culture du 3C9-D11-H11	42
3.3 Anticorps polyclonaux porcins	43
4. IMMUNOFLUORESCENCE	43
5. PCR SUR CLONES PPV INFECTIEUX	44
5.1 Amplification de l'ADN	44
5.2 Analyse des produits de PCR	47
6. CLONAGE DES PRODUITS DE PCR	47
6.1 Extraction des produits de PCR sur gel d'agarose	47
6.2 Digestion enzymatique du vecteur et de l'ADN purifié	48
6.3 Ligation de l'insert au vecteur pUCBM20	48
6.4 Préparation de cellules compétentes <i>E. coli</i> XL-1 blue	50
6.5 Transformation des bactéries XL-1 compétentes	50
6.5.1 Culture des colonies	51

6.6	Extraction rapide de l'ADN plasmidique des colonies recombinantes	51
6.7	Purification des plasmides recombinants	52
6.7.1	Digestion enzymatique et analyse sur gel	52
6.7.2	Maxipréparation des clones positifs	52
6.8	Séquençage du gène codant pour la protéine VP2	53
7.	CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pPICZB	53
7.1	Production du vecteur d'expression pPICZB	55
7.2	Ligation et transformation	55
7.3	Ligation dans le vecteur d'expression	58
7.4	Transformation des bactéries	58
7.5	Analyse des recombinants	58
7.5.1	Digestion des clones	58
7.5.2	Séquençage des recombinants pPICZB	59
8.	TRANSFORMATION DES LEVURES <i>PICHA PASTORIS</i>	59
8.1	Préparation des levures compétentes	59
8.2	Linéarisation du vecteur	60
8.3	Transformation des levures	60
8.4	Extraction d'ADN génomique des levures	61
8.5	Analyse des recombinants par PCR	62
9.	EXPRESSION DES CAPSIDES RECOMBINANTES	63
9.1	Induction des levures recombinantes	63
9.1.1	Préparation des échantillons	64
9.2	Détection des capsides recombinantes	65
9.2.1	Électrophorèse sur gel SDS-PAGE	65
9.2.2	Microscopie électronique par imprégnation négative	66
9.2.3	Détection des capsides par test ELISA	66
10.	ANALYSE TRADUCTIONNELLE DE LA VP2	67
10.1	Extraction de l'ARN total de <i>Pichia pastoris</i>	67
10.2	Réaction de transcriptase inverse	68
10.3	Réaction d'amplification de l'ADN _c	69
11.	ASSEMBLAGE D'UN FRAGMENT SYNTHÉTIQUE DU GÈNE DE LA VP2	69
11.1	Synthèse des oligonucléotides	69
11.2	Appariement des oligonucléotides	70
11.2.1	Assemblage	70
11.2.2	Amplification	71
11.2.3	Clonage du gène synthétique	75

12. CLONAGE ET EXPRESSION DU GÈNE PARTIELLEMENT SYNTHÉTIQUE	75
12.1. Immunobuvardage de type WESTERN	76
13. PRODUCTION DE CAPSIDES RECOMBINANTES DANS BACULOVIRUS ..	79
13.1 Production protéique	79
13.2 Purification des capsides recombinantes	80
14. SÉLECTION DES PHAGOTOPES DES CAPSIDES RECOMBINANTES PPV À L'AIDE DE LIBRAIRIES PEPTIDIQUES	81
14.1 Librairies peptidiques	81
14.2 Titrage des phages	82
14.3 Sélection par affinité	82
14.3.1 Stratégies employées	82
14.3.2 Enrichissement en phages spécifiques	83
14.4 Spécificité des clones sélectionnés	83
14.4.1 Production des phages	84
14.4.2 Test ELISA	84
14.5 Librairie FliTrx™	85
15. MUTANTS ÉCHAPPATOIRES	86
15.1 Expériences préliminaires	86
15.2 Mesure du titre viral	87
15.3 Quantification des molécules virales	87
15.3.1 Préparation du standard interne	87
15.3.2 PCR Quantitatif-compétitif (Qc-PCR)	88
15.4 Sélection des mutants échappatoires et analyse	89
15.5 PCR sur mutants échappatoires	89
RÉSULTATS	91
1. CLONAGE DU GÈNE CODANT POUR LA VP2	92
1.1 Amplification du gène VP2	92
1.2 Clonage dans le vecteur pUCBM20	92
1.3 Séquençage	96
2. CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pPICZB	96
3. TEST D'EXPRESSION DANS LA LEVURE <i>PICHA PASTORIS</i>	96
3.1 Transformation des levures	96
3.2 Analyse des recombinants par réaction de polymérase en chaîne (PCR) ...	97
3.3 Test de production protéique de la VP2	97
3.4 Détection des capsides recombinantes	97

4. ANALYSE TRADUCTIONNELLE DE LA VP2	102
5. GÈNE PARTIELLEMENT SYNTHÉTIQUE DE LA VP2	105
5.1 Construction du gène partiellement synthétique	105
5.2 Clonage	105
5.3 Expression de la VP2 synthétique	105
5.4 Immunodétection	109
6. PRODUCTION DE CAPSIDES RECOMBINANTES DANS BACULOVIRUS ..	109
7. SÉLECTION DE PEPTIDES D’AFFINITÉ ENVERS LES VLPs DU PPV	114
7.1 Enrichissement en phages spécifiques	114
7.1.1 Spécificité des phages isolés	115
7.2 Affichage du bactériophage: nouvelle méthodologie	118
7.2.1 Enrichissement en phages spécifiques	118
7.2.2 Spécificité des phages isolés	120
7.2.3 ELISA sur clones sélectionnés	120
8. MUTANTS ÉCHAPPATOIRES	123
8.1 Unités de fluorescence focale des mutants échappatoires	123
8.2 Quantification des molécules virales	123
8.3 PCR sur mutants échappatoires	124
DISCUSSION	131
CAPSIDES RECOMBINANTES DU PPV DANS <i>PICHA PASTORIS</i>	132
SYSTÈME D’EXPRESSION DU BACULOVIRUS	137
SÉLECTION DES PHAGOTOPES DES CAPSIDES RECOMBINANTES PPV À L’AIDE DE LIBRAIRIES PEPTIDIQUES	138
MUTANTS ÉCHAPPATOIRES DU PPV	139
CONCLUSION	142
REMERCIEMENTS	145
BIBLIOGRAPHIE	147
ANNEXE	159

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1: Parvovirus autonomes des vertébrés	6
Tableau 2: Différentes souches du PPV et la souche initiale d'isolement	21
Tableau 3: Différents groupes du PPV	22
Tableau 4: Construction des clones infectieux chimériques du PPV	24
Tableau 5: Amorces utilisées pour le séquençage du gène codant pour la protéine VP2 du PPV inséré dans le vecteur pUCBM20	54
Tableau 6: Fréquence d'utilisation des codons de gènes exprimés à haut niveau dans la levure <i>P. pastoris</i>	72
Tableau 7: Oligodésoxyribonucléotides utilisés pour l'assemblage d'un fragment synthétique de 400 pb codant pour une partie du gène VP2 dans le but d'optimiser l'expression dans la levure <i>Pichia pastoris</i>	74
Tableau 8: Exemples de rendement de différentes librairies peptidiques en fonction de la ronde de sélection en phages spécifiques	116
Tableau 9: Séquences des peptides isolés sur plaques multi-puits à l'aide de la librairie Ph.D.-7™	117
Tableau 10: Rendement des phages sélectionnés avec des capsides recombinantes du PPV en utilisant des plateaux de 60 mm	119
Tableau 11: Séquences des peptides isolés sur plateau de culture de 60 mm à l'aide de la librairie Ph.D.-12™	121
Tableau 12: Titre viral des mutants échappatoires déterminé par unités de fluorescence focale (ffu) après chaque ronde de sélection	125

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1:	8
Figure 2:	9
Figure 3:	10
Figure 4:	12
Figure 5:	19
Figure 6:	25
Figure 7:	38
Figure 8:	46
Figure 9:	49
Figure 10:	57
Figure 11:	78
Figure 12:	93
Figure 13:	95
Figure 14:	99
Figure 15:	101
Figure 16:	104
Figure 17:	106
Figure 18:	108
Figure 19:	111
Figure 20:	113

Figure 21:	Détection de VLPs du PPV à l'aide de peptides monoclonaux exposés en surface de phage	122
Figure 22:	Résultats de l'expérience de Qc-PCR du PPV sauvage	127
Figure 23:	Résultats de l'expérience de Qc-PCR des mutants échappatoires	129
Figure 24:	Visualisation sur gel d'agarose d'amplicons obtenus après amplification par PCR de mutants viraux échappatoires	130

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.	:	Acide aminé
AAV	:	Virus adéno-associé
ADN	:	Acide désoxyribonucléique
ADN _c	:	ADN complémentaire
ADV	:	Virus de la maladie aléoutienne
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
ATCC	:	American Type Culture Collection
BPV	:	Parvovirus bovin
BSA	:	Albumine sérique bovine
CHCl ₃	:	Chloroforme
CPV	:	Parvovirus canin
CsCl	:	Chlorure de césium
D.O.	:	Densité optique
Da	:	Dalton
DEPC	:	Diéthyl pyrocarbonate
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	:	Diméthyl sulfoxide
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	:	Enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	:	Sérum foetal bovin
FFU	:	Unité de fluorescence focale
FPV	:	Virus de la panleucopénie féline
GPV	:	Parvovirus de l'oie
HaPV	:	Parvovirus du hamster
IF	:	Immunofluorescence
IPTG	:	Isopropylthio- β -D-galactoside

LPV	:	Parvovirus du lapin
MEV	:	Virus de l'entérite du vison
MPV	:	Parvovirus murin
MVC	:	Minivirus canin
MVM	:	Minivirus murin
NS	:	Protéine non-structurale
OLIGO	:	Oligodésoxyribonucléotide
OPD	:	O-phénylenediamine
ORF	:	Cadre de lecture ouvert
pb	:	Paires de bases
PBS	:	Tampon phosphate salin
PCR	:	Réaction de polymérase en chaîne
PFT	:	Trompe de Fallope porcine
PFU	:	Unité de formation de plaque
PMSF	:	Phénylméthylsulfonyl
PPV	:	Parvovirus porcin
PTA	:	Acide phosphotungstique
PVDF	:	Polyvinylidene difluoride
Qc-PCR	:	PCR Quantitatif-compétitif
RPV	:	Parvovirus du raton laveur
RV	:	Virus Kilham du rat
SDS	:	Dodécylsulfate de sodium
SDS-PAGE	:	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium
SFM	:	Milieu sans sérum
U	:	Unité
VLP	:	Capside recombinante virale
VP	:	Protéine structurale
X-gal	:	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside
YNB	:	Base azotée de levures

SOMMAIRE

Les dernières années nous ont apporté des études détaillées de la structure et du génome de différents parvovirus autonomes. Ces travaux ont permis de mieux comprendre certains mécanismes utilisés par ces virus pour s'adapter à l'hôte. C'est par le biais des protéines de la capsid virale que le parvovirus interagit avec la cellule cible.

La recherche réalisée sur le parvovirus porcin (PPV) au laboratoire du docteur Peter Tijssen a permis de conclure que 3 acides aminés portés en surface des protéines de la capsid virale sont impliqués dans la différence de tropisme *in vitro* de souches associées à des pathologies diverses (Bergeron *et al.*, 1996). Outre le tropisme, la capsid virale est impliquée dans différentes fonctions virales. Les déterminants régissant ces fonctions importantes sont très peu connus pour le PPV. Ce projet visait donc à identifier des déterminants de surface du PPV pouvant jouer des rôles importants à plusieurs niveaux (exemple: l'hémagglutination, l'attachement et l'entrée dans une cellule et la réponse immunitaire). Une connaissance plus approfondie des déterminants permet d'ouvrir la voie vers la création de nouveaux vaccins plus efficaces.

Pour étudier les déterminants de surface, nous avons choisi d'utiliser une banque peptidique présentée en surface de phages, dirigés contre la capsid recombinante du PPV produite dans le système d'expression du baculovirus. Cette étape nous a permis d'isoler plusieurs séquences peptidiques différentes, de grande affinité envers les capsides recombinantes. Ces résultats permettent d'affirmer que, tout comme pour les différents parvovirus autonomes, plusieurs déterminants différents sont responsables de divers fonctions différentes. Une étude plus approfondie permettra de déterminer quelles fonctions sont associées à ces différents déterminants par un blocage fonctionnel à l'aide des différentes séquences peptidiques isolées. D'autre part, des résultats préliminaires de l'analyse de mutants échappatoires viraux nous portent à croire qu'un site de reconnaissance d'un anticorps neutralisant serait situé en position N-terminale de la protéine structurale VP-2, à proximité d'une région riche en glycine. Ce résultat concorde avec des résultats similaires obtenus pour des parvovirus apparentés au PPV.

INTRODUCTION

En 1965, Howard Dunne décrivait sous le nom S.M.E.D.I., un syndrome relié à des troubles de reproduction chez le porc. Ce n'est que dix années plus tard qu'on attribuait au parvovirus porcin (PPV) le titre d'agent causal majeur de ce syndrome. L'acronyme S.M.E.D.I. signifie des mort-nés (Stillbirths), des foetus momifiés (Momified fetuses), des morts précoces d'embryons (Embryonic Death) et des problèmes d'infertilité (Infertility). Le PPV a été retrouvé à travers le monde dans des tissus porcins, des foetus momifiés et comme contaminant de cultures cellulaires (Molitor et Joo, 1990).

Le PPV est un agent pathogène omniprésent qui représente un fardeau économique important imposé aux élevages porcins. Les pertes qu'il peut causer à l'industrie porcine américaine sont non seulement importantes pendant les épidémies, mais aussi lors de la baisse de parturition consécutive à l'infection. Outre son impact économique, ce virus retient également l'attention des scientifiques et des comités de bioéthique quant à l'utilisation des organes porcins en xénotransplantation, étant donné que le PPV, suite à des pressions évolutives, pourrait s'adapter à l'homme. Une telle inquiétude se base sur le fait que le tropisme de différentes souches du PPV (virulentes versus avirulentes), tel que démontré au laboratoire du docteur Tijssen, n'est régulé que par quelques acides aminés (Bergeron *et al.*, 1996). Une modification du spectre d'hôte a déjà été notée pour plusieurs parvovirus: le parvovirus canin (CPV) et le parvovirus du vison (MEV) en sont des exemples.

Les différentes souches du PPV (et de la majorité des parvovirus des vertébrés) ne démontrent souvent que de très minimes différences au niveau génomique. Des travaux réalisés au laboratoire du docteur Tijssen ont permis d'attribuer la différence de tropisme *in vitro* de différentes souches du PPV à trois acides aminés situés en surface de la capside (Bergeron *et al.*, 1996). Ces travaux sont en accord avec des études similaires réalisées sur le CPV et le parvovirus murin (MVM) démontrant ainsi que les différences reliées au tropisme observées entre les souches d'un même virus sont principalement causées par un nombre restreint de variations au niveau des protéines de la capside virale.

Outre le tropisme, les protéines de la capside régissent aussi le spectre d'hôte et les propriétés antigéniques de différents parvovirus (revue par Truyen et Parrish, 1995). Le tropisme *in vitro* du PPV et probablement les différences pathologiques de souches distinctes sont définis par sa capside (Bergeron *et al.*, 1996). La capside est impliquée dans diverses fonctions chez ce virus, mais les déterminants associés à ces propriétés demeurent toujours inconnus.

Beaucoup de nouveaux virus émergent suite à une expansion croissante de populations cibles, à leurs migrations, ou aux changements écologiques. Néanmoins, l'apparition de nouveaux parvovirus fait suite aux variations et à l'évolution de leur génome. Étant donné que l'emplacement génétique des déterminants régissant plusieurs fonctions virales a été identifié sur la capside de différents parvovirus, ce projet consistait avant tout à produire des capsides recombinantes du PPV afin d'étudier les déterminants de surface à l'aide de bibliothèques peptidiques affichées en surface de phages. Par la suite, grâce à des mutants échappatoires, une étude de la structure antigénique pouvait être amorcée. Ce projet entrait d'une part dans le cadre d'une étude à long terme visant à élucider les mécanismes moléculaires dictés par des déterminants de surface du PPV. D'autre part, ce projet cadrerait dans l'étude tri-dimensionnelle de particules recombinantes du PPV, effectuée en collaboration avec l'équipe du docteur M.G. Rossmann, dans le but d'obtenir des détails structuraux du déterminant allotropique et d'établir des relations structure-fonctions pour différents domaines de la capside.

Pour répondre à ces objectifs, il fallait se prévaloir d'un système d'expression hétérologue de capsides recombinantes (VLPs: "**V**irus-like **P**articles"). Par la suite, des déterminants de surface de la particule pouvaient être identifiés. Ces déterminants pourraient jouer des rôles dans l'attachement et l'entrée du virus en cellules-cible, dans l'interaction avec le système immunitaire, ou dans le pouvoir hémagglutinant du PPV. Ces travaux avaient donc pour but de mieux comprendre l'interaction du PPV avec l'hôte pour éventuellement permettre de créer de nouveaux vaccins plus efficaces.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. GÉNÉRALITÉS

1.1 Classification des parvovirus

Les parvovirus sont parmi les plus petits et plus “simples” virus. La famille des *Parvoviridae* englobe deux sous-familles: celle des *Parvovirinae*, virus de vertébrés, et celle des *Densovirinae*, constituée de virus qui infectent les insectes (invertébrés). La sous-famille des *Parvovirinae* regroupe trois genres. Premièrement, les *Dependovirus*, aussi connus sous le nom de “adeno-associated virus” (AAV), nécessitent une co-infection par un virus auxiliaire (“helper”), un adénovirus ou un herpesvirus, pour une infection productive (Atchison *et al.*, 1965). Deuxièmement, le genre *Erythrovirus* renferme, entre autres, un parvovirus associé à des pathologies chez l’homme, soit le B19. Finalement, le genre *Parvovirus* (virus autonomes) regroupe la majeure partie des parvovirus (tableau 1) comptant, entre autres, le minivirus de la souris “minute virus of mice” (MVM), le CPV et le PPV.

1.2 Pathologie des parvovirus autonomes

Les parvovirus se répliquent dans le noyau des cellules infectées et les maladies observées chez l’hôte reflètent d’une dépendance aux fonctions cellulaires pour la réplication de ces virus. En effet, la réplication des parvovirus autonomes nécessite un passage des cellules en phase S du cycle cellulaire (Berns et Labow, 1987), car les parvovirus n’ont pas la capacité de stimuler la synthèse de l’ADN de cellules qui ne sont pas au stade de division. Cette dépendance au cycle cellulaire explique pourquoi le tropisme de ces virus est principalement ciblé aux tissus en division rapide, soient: le fœtus, l’épithélium intestinal et le système hématopoïétique. Ce tropisme démontre en partie que ces virus causent des affections beaucoup plus graves chez les nouveau-nés que chez l’animal adulte.

Tableau 1: Parvovirus autonomes des vertébrés

(Tiré et adapté de Siegl, 1990)

MEMBRES	HÔTES
Minivirus de la souris (MVM)	souris, rat
Parvovirus Toolan du rat (H-1)	rat
Parvovirus Kilham du rat	rat
Parvovirus RT	rat
Virus de la maladie aléoutienne du vison (ADV)	vison, furet, moufette, raton, renard (?)
Virus de l'entérite du vison (MEV)	vison, raton
Parvovirus canin (CPV)	chien
Minivirus du chien (MVC)	chien
Parvovirus félin	chat
Parvovirus de l'oie (GPV)	oie
Parvovirus HB	hamster (?)
RA-1	homme
Parvovirus du lapin (LPV)	lapin
Parvovirus bovin (BPV)	boeuf
Parvovirus porcin (PPV)	porc
Parvovirus du raton (RPV)	raton laveur
Virus de la tumeur X	inconnu
LuIII	inconnu

Une infection parvovirale productive cause la lyse cellulaire (Cotmore et Tattersall, 1987). Les parvovirus sont souvent responsables de problèmes de reproduction chez plusieurs espèces animales. Les parvovirus félin, canin et du vison sont intimement reliés et produisent chez leur hôte des maladies similaires, particulièrement concernant la production d'une panleucopénie (diminution du nombre de globules blancs du sang) et des entérites chez les animaux en bas âge (Studdert, 1990). Chez les rongeurs, par contre, les effets de l'infection virale sont souvent asymptomatiques (MVM, parvovirus murin [MPV], virus Kilham du rat [RV]) ou peuvent causer des perturbations des fonctions immunitaires (MVM(i), MPV-1a, RV) ou des anomalies du développement chez le hamster (HaPV) (Jacoby *et al.*, 1996). Chez les bovins (BPV), on assiste à des troubles reproducteurs et à des infections respiratoires en association avec d'autres agents.

Le parvovirus B19, membre du genre *Erythrovirus*, de la famille des *Parvoviridae*, est pathogène chez l'humain et est associé à un éventail de maladies. Chez les individus sains, l'infection au B19 se traduit principalement en un érythème infectieux. Chez les patients avec troubles hémolytiques sous-jacents, l'infection est la cause primaire de la crise aplastique transitoire. Chez les patients immuno-déprimés, une infection persistante peut se développer en une aplasie des cellules rouges et une anémie chronique. L'infection intra-utérine peut provoquer l'*hydrops fetalis* ou une anémie congénitale (Brown et Young, 1997). L'implication du B19 dans les maladies auto-immunes est également mentionnée dans une revue de Naides de 1998.

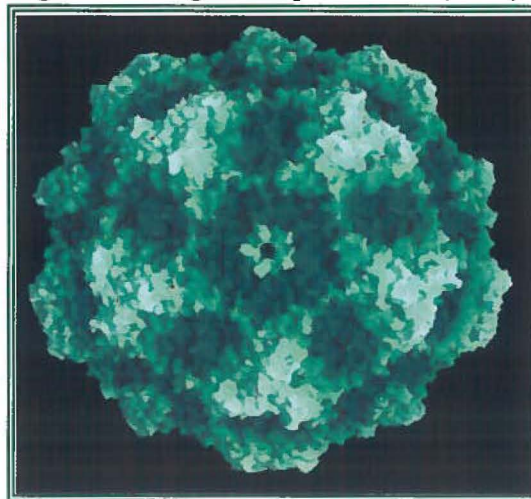
Il a été rapporté par Cotmore et Tattersall (1987) que les différences pathologiques sont non seulement observables entre différents sérotypes, mais aussi pour différentes souches virales d'un même sérotype.

1.3 Caractéristiques du virion

1.3.1 Propriétés du virion

Les parvovirus sont parmi les plus petits virus à ADN pouvant infecter les animaux. Le génome viral monocaténaire est linéaire et constitué d'environ 5000 nucléotides. L'ADN viral est encapsidé dans un virion à symétrie icosaédrale de 20 à 25 nm de diamètre. Aucun lipide, hydrate de carbone, ni enzyme ou histone, n'est contenu dans la particule virale (Siegl *et al.*, 1985).

Figure 1: Image d'un parvovirus (CPV)

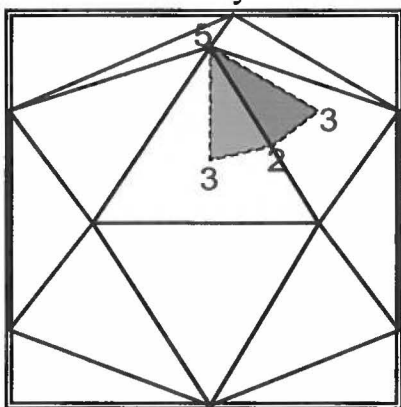


Les particules possèdent une densité de flottaison de 1,41 g/ml (particules infectieuses pleines contenant l'ADN génomique) et de 1,32 g/ml (particules non infectieuses vides sans ADN) dans un gradient de chlorure de césium (CsCl) et des coefficients de sédimentation de 110S et 70S respectivement (Siegl *et al.*, 1985). Le poids moléculaire de ces particules se situe entre 5,5 et 6,2 x 10⁶ daltons (Da) pour les particules pleines et 4,2 x 10⁶ Da pour les particules vides.

L'ADN génomique des parvovirus représente de 19 à 32% de la masse totale d'une particule infectieuse; les protéines structurales (VP) complètent le reste. La capside virale est généralement composée de trois polypeptides principaux, soient: la VP1 (83-86 kDa), la VP2 (64-66 kDa), en majeure partie, et la VP3 qui provient d'un clivage protéolytique de la VP2 chez les virions matures seulement (revue par Cotmore et Tattersall, 1987). Il est à noter qu'il y a environ une protéine VP1 pour six protéines VP2 à la capside virale du PPV.

1.3.2 Structure du virion

Figure 2: Structure d'un icosaèdre et d'une sous-unité avec ses axes de symétrie

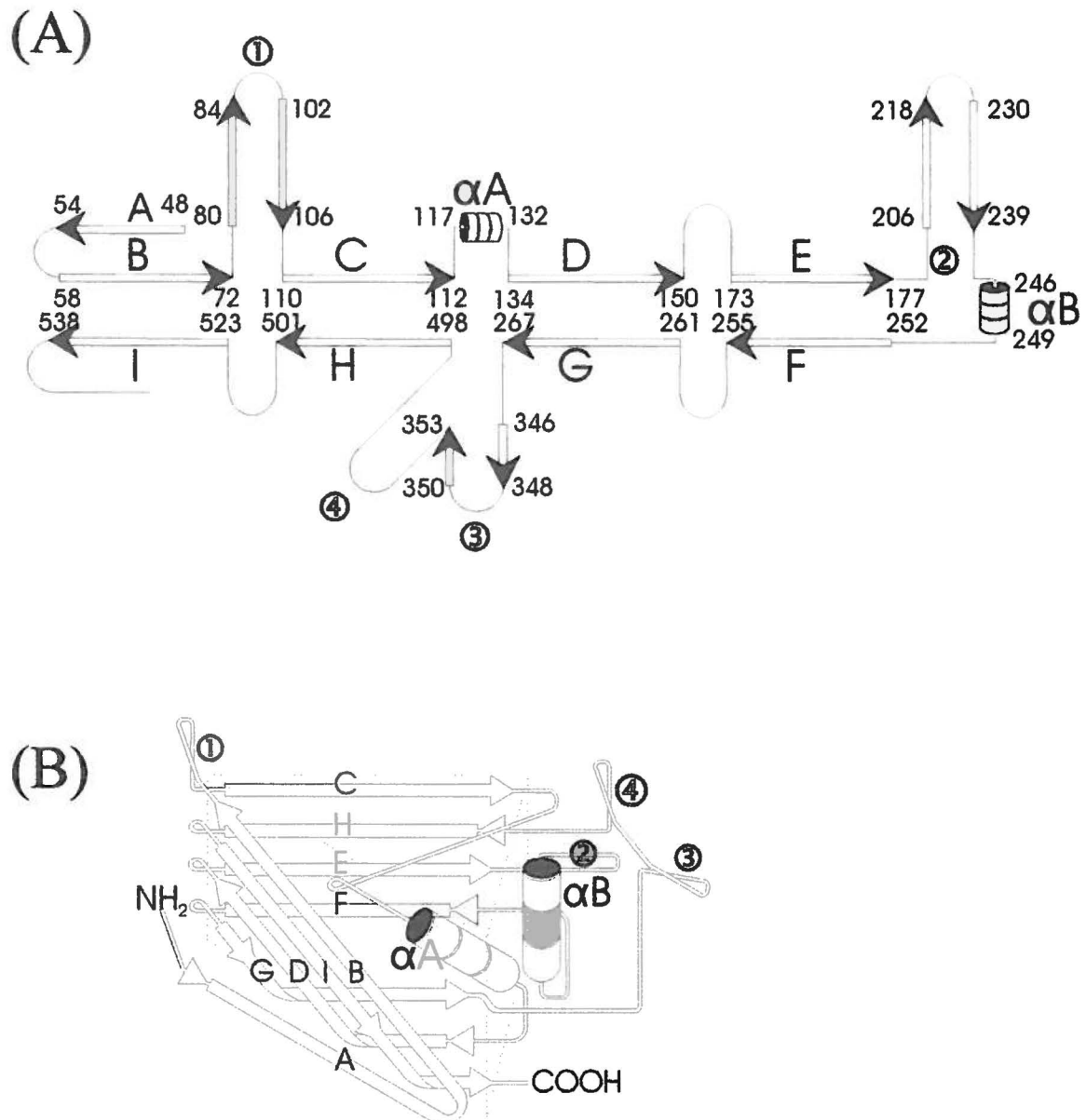


La structure du parvovirus est un icosaèdre de symétrie $T=1$ formé de 60 protomères. Pour mieux comprendre la structure d'un parvovirus, il faut comprendre ce qu'est un icosaèdre. Cette structure géométrique (figure 2) comprend 20 triangles équilatéraux arrangés autour de la face d'une sphère. L'icosaèdre possède des axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5. Il y a en fait six axes de symétrie d'ordre 5 passant au travers des sommets, 10 axes d'ordre 3 s'allongeant au travers de chaque face et 15 axes de symétrie d'ordre 2 passant au travers des arêtes de l'icosaèdre.

Le motif structural principal des parvovirus consiste en un baril- β composé de huit feuillets- β anti-parallèles dont la majeure portion des acides aminés (deux tiers) forme de larges boucles reliant les brins de la structure en baril- β (figure 3). Ces boucles forment à elles-mêmes une grande partie de la structure des capsides et sont plus souvent qu'autrement localisées en surface virale ce qui a pour conséquence qu'elles sont souvent impliquées dans d'importantes fonctions biologiques des parvovirus. À titre d'exemple, chez le CPV (figure 3), la boucle 1 compte 36 a.a. entre les feuillets βB et βC ; la boucle 2 est formée de 74 résidus entre les feuillets βE et βF ; tandis que les boucles 3 et 4 émergent des 223 a.a joignant les feuillets βG et βH tout en étant majoritairement responsables des protubérances de 22Å retrouvées aux axes de symétrie d'ordre 3. La topologie de surface démontre qu'il existe une protubérance de 70Å à l'axe de symétrie d'ordre 3, une légère dépression à l'axe de symétrie d'ordre 2 et un pore cylindrique entouré d'une dépression de 15Å ("canyon") à l'axe de symétrie d'ordre 5.

Figure 3: Structure du CPV
(Tiré de Tijssen, 1999)

Les principaux feuillets- β et hélices- α sont schématisés par des flèches et des bobines, respectivement (A). Les boucles en surface sont numérotées de 1 à 4. La structure du baril- β est également représentée (B).



Les “cartes routières” (roadmaps) de la surface virale de CPV/FPV représentent une projection d’une unité icosaédrale asymétrique démontrant les a.a. accessibles au solvant (figure 4). La variabilité des résidus de surface des parvovirus est encline à l’information sur les propriétés antigéniques et l’interaction de ceux-ci avec un récepteur. Ce genre d’étude fut particulièrement efficace dans le cas du rhinovirus où les sites d’attachement des anticorps neutralisants ont été attribués à des régions très exposées et très variables de ce virus (Rossmann et Palmenberg, 1988; Chapman et Rossmann, 1993). Par contre, le site d’attachement au récepteur, formant une cavité tel un canyon serait plutôt composé d’a.a. conservés et difficiles d’accès aux anticorps. La validité de cette hypothèse du canyon n’est pas aussi évidente pour les parvovirus (Chapman et Rossmann, 1993).

1.3.3 Propriétés biochimiques

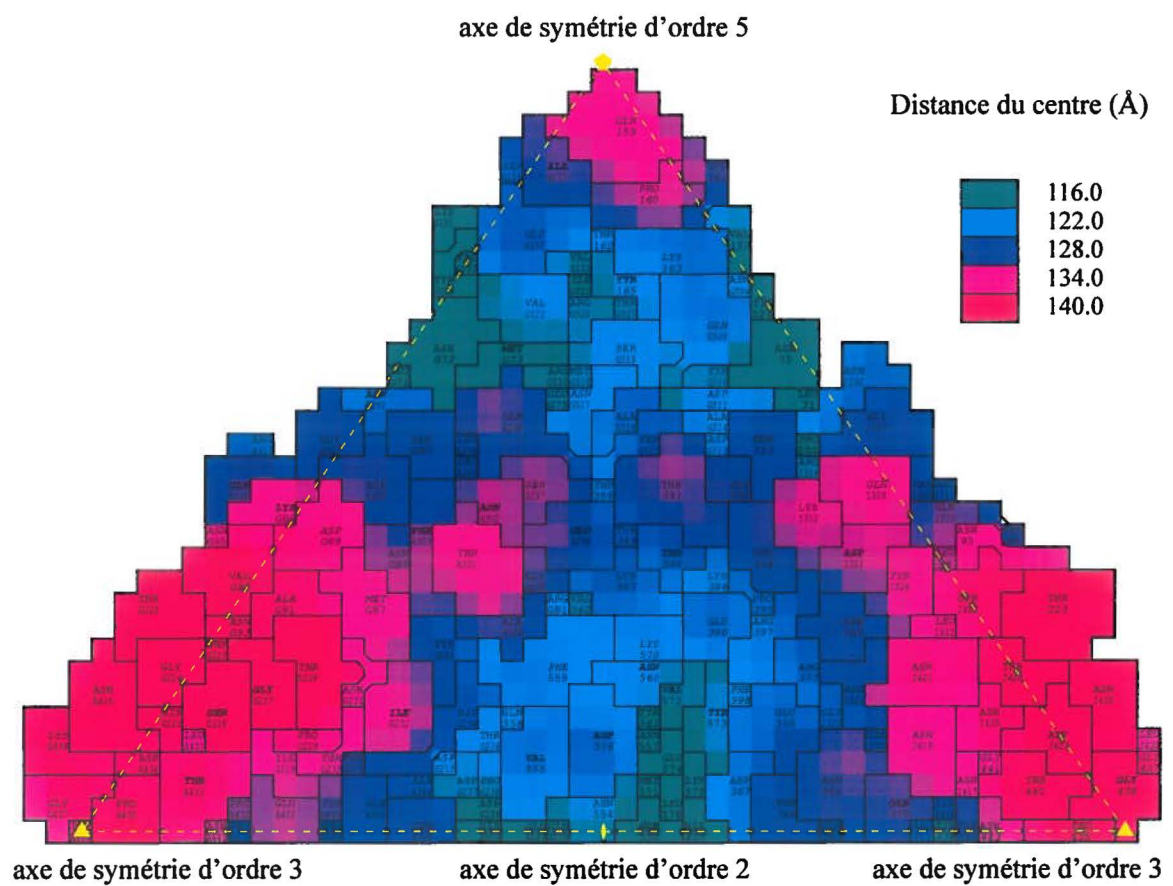
Les parvovirus sont des virus très stables. Les particules virales résistent à l’extraction par des solvants lipidiques, à des pH de 2 à 11, à une température de 56°C pendant une heure (deux heures à 80°C pour le virus non purifié), et aux solutions à concentration relativement élevée en sel comme les gradients de CsCl (Siegl *et al.*, 1985). L’arrangement compact de la particule virale est responsable de ces propriétés.

Le virion résiste également aux ultrasons (sans chaleur) et à beaucoup de détergents mais il est sensible à l’irradiation aux ultraviolets et la capside est dissociée dans des solutions de dodécylsulfate de sodium (SDS).

De plus, les parvovirus résistent à plusieurs enzymes comme les nucléases (RNase et DNase) et les protéases (papaïne, chymotrypsine, trypsine, pepsine). Mayr et collaborateurs (1968), tel que rapportés par Kurstak et Tijssen en 1981, ont observé qu’un traitement à la trypsine pouvait parfois même augmenter le titre infectieux de ce virus.

Figure 4: Topologie de surface du CPV
(Tiré et adapté de Chapman *et al.*, 1993)

Illustration des a.a. de surface et les différents axes de symétrie d'une unité de la capside.



1.3.4 Propriétés antigéniques

Les parvovirus “classiques” ont été identifiés et différenciés les uns des autres par la spécificité de déterminants antigéniques présentés en surface de leur capside intacte. Étant donné que la majorité de ces virus ont la propriété d’agglutiner les érythrocytes de plusieurs espèces animales (exemples: cobayes, humains, cochons), les sérotypes peuvent être déterminés, spécialement sur une base préliminaire, par les différents patrons d’hémagglutination. Néanmoins, des disparités peuvent survenir et des études de neutralisation sérique sont également nécessaires afin de séparer les parvovirus autonomes en de nombreux sérotypes (tableau 1).

À titre d’exemple, en utilisant 13 anticorps monoclonaux dirigés contre le CPV et 8 anticorps monoclonaux dirigés contre le FPV, Parrish et Carmichael (1983) ont pu démontrer de nettes différences entre quatre virus du groupe FPV (FPV, CPV, MEV, et RPV) et entre plusieurs isolats du même sous-type. Une quatrième et cinquième génération de CPV et FPV passées en culture cellulaire étaient ajoutées aux cellules en présence de nombreux anticorps monoclonaux homologues différents et des variants viraux pré-existants pouvaient être sélectionnés à des taux de fréquence de 10^{-4} et 10^{-7} . Ces travaux ont en partie permis de démontrer que la surface de la capside du sérotype FPV contenait différentes régions antigéniques neutralisantes, chacune comprenant différents épitopes se chevauchant.

Des passages répétés *in vitro* d’un isolat du CPV, le CPV-a, dans des cellules rénales du chien, suivis de 10 passages en cellules rénales NL du chat, ont permis d’isoler un virus qui pouvait croître *in vitro* dans des cellules du chat mais qui avait perdu l’habileté de se répliquer de façon productive dans des cellules canines (Parrish et Carmichael, 1986). En manipulant des génomes viraux recombinants entre ce mutant et un isolat sauvage du CPV, le CPV-d, Parrish et Carmichael ont pu cartographier la localisation des épitopes incriminés dans les différences antigéniques et le spectre d’hôte à une petite région du gène de la capside.

Ils ont ensuite démontré, par analyse d'ADN, qu'il n'y avait que deux changements de nucléotides dans cette région et que ceux-ci altéraient les acides aminés spécifiés par deux codons adjacents. Nous reviendrons plus en détails sur les relations structure-fonctions dans une section ultérieure. Il est important de noter que la structure de la surface de la particule virale, tel que démontré par l'expression ou l'absence de certaines configurations antigéniques, peut avoir une importante influence sur l'habileté du virus à se répliquer dans une cellule-hôte spécifique. Cette spécificité, qui est assurée par la capside, peut être impliquée dans des interactions intracellulaires avec des facteurs cellulaires de l'hôte, de même que, ou plutôt que, dans l'attachement à un récepteur cellulaire de surface.

Finalement, ce sont les travaux des groupes de Parrish (CPV), Tattersall (MVM) et Tijssen (PPV) qui ont permis de démontrer que les différences reliées au tropisme observées entre les différentes souches d'un même sous-groupe sont principalement causées par un nombre restreint de variations au niveau des protéines de la capside du virus.

1.4 Structure du génome viral

Les membres de la famille *Parvoviridae* sont uniques parmi tous les virus connus pour leur génome à ADN linéaire et monocaténaire. Les similarités au niveau de la structure du génome, de l'organisation et des séquences codantes des membres de cette famille, suggèrent qu'ils utilisent tous la même stratégie de réplication, soit le modèle de "l'épingle à cheveux roulante" (Tattersall et Ward, 1976).

Le génome du parvovirus est formé d'une molécule d'ADN linéaire qui est flanquée par de petites (121-421 bases) séquences terminales palindromiques capables de se replier en une structure d'épingle à cheveux (revue par Cotmore et Tattersall, 1995). Ces structures sont essentielles pour l'initiation de la réplication du génome viral. Le brin encapsidé est souvent d'une polarité, invariablement le brin négatif <-> (complémentaire à l'ARN messager [ARNm]) ou un mélange (selon le virus) de brins des deux polarités encapsidés

dans des virions différents (Siegl *et al.*, 1985). Par convention, le génome est toujours représenté comme le brin codant positif <+> (direction 5'-3' de l'ARNm).

1.4.1 Organisation et stratégie d'utilisation du génome viral

Chez les parvovirus autonomes, il y a une région fortement conservée qui est constituée de plusieurs résidus glycine. Elle est localisée à proximité de la partie N-terminale de la VP2. Le rôle exact de cette séquence riche en glycine demeure inconnu. Cette séquence pourrait jouer un rôle dans l'insertion du virion dans la membrane cellulaire lors de l'infection.

Le génome viral de différents parvovirus est organisé en deux cadres de lecture ouverts (ORF). De l'extrémité 5' à l'extrémité 3' du brin codant <+> (figure 5), on retrouve d'abord le cadre de lecture ouvert codant pour les protéines virales non structurales (NS), tandis que celui de droite code pour les protéines structurales (VP, pour "viral proteins"). Étant donné les similitudes des stratégies d'utilisation du génome viral chez les différents parvovirus autonomes, le modèle du PPV décrit par Bergeron et collaborateurs en 1993 est retenu et sera analysé en détails dans la prochaine section.

2. PARVOVIRUS PORCIN

2.1 Introduction

Le PPV est un virus associé à de nombreuses maladies chez le porc, incluant des troubles de reproduction, des lésions cutanées et des cas de diarrhée chez les porcelets (Tijssen et Bergeron, 1994). Ce virus fait partie du genre parvovirus et possède des propriétés similaires avec d'autres parvovirus de vertébrés, notamment le MVM, H1, CPV, FPV, tant au niveau physico-chimique, que génomique.

L'infection au PPV ne cause normalement pas de signe clinique chez l'adulte ou chez le jeune porc. Cependant, le PPV a parfois été impliqué dans de sévères dermatites (Kresse *et al.*, 1985) et des entérites (Dea *et al.*, 1985). Après une exposition au PPV, une virémie survient chez les animaux séronégatifs (Joo *et al.*, 1976; Mengeling *et al.*, 1976). Une virémie est nécessaire pour que le PPV traverse le placenta pour ainsi infecter l'embryon ou le fœtus. La souche avirulente NADL-2 ne peut induire une virémie ce qui a pour conséquence qu'elle est incapable de traverser le placenta et infecter le fœtus (Lenghaus *et al.*, 1978). D'autres souches (exemple: Kresse) peuvent traverser le placenta suite à une virémie. Ces souches sont dites pathogènes. Nous reviendrons sur les propriétés pathogéniques des différentes souches à la section 2.4.1.

2.2 Aspects moléculaires

Les propriétés physiques et biochimiques du PPV sont similaires aux autres parvovirus des vertébrés. Brièvement, le PPV est constitué de trois polypeptides structuraux. Les protéine VP1 (84 kDa) et VP3 (60 kDa), mais surtout la protéine VP2 (64 kDa), forment la capside virale. De plus, le génome du PPV code pour deux protéines non-structurales: NS1 (75,5 kDa) et NS2 (18,1 kDa). La présence d'une troisième protéine non-structurale demeure hypothétique. Les protéines NS sont au centre de la réplication et de l'expression du génome viral des parvovirus. La protéine NS1 est multi-fonctionnelle, elle possède une activité hélicase, une activité endonucléase, de même qu'une activité ATPase, toutes impliquées dans la réplication et la résolution de l'intermédiaire réplcatif (revue par Corsini *et al.*, 1996). La protéine NS2, quant à elle, semble être impliquée dans la spécificité cellule/espèces des parvovirus. Le rôle exact des protéines non-structurales chez le PPV reste à être déterminé. Cette facette du PPV fait d'ailleurs l'objet de travaux effectués au laboratoire du docteur Peter Tijssen.

Le PPV est un virus à ADN monocaténaire de polarité négative (complémentaire à l'ARN messager) composé d'environ 5000 nucléotides. Les deux extrémités du génome viral peuvent se replier sous forme d'épingle à cheveux nécessaires à la réplication.

2.3 Organisation génomique

Avant-Propos: Afin de bien visualiser l'information sur l'organisation génomique du parvovirus porcin, le lecteur est référé à la figure 5 tout au long de cette section. Cette figure est essentielle à la compréhension du texte. Les données rapportées dans cette figure sont le fruit des études doctorales de Jean Bergeron (1992) au laboratoire du docteur Peter Tijssen.

L'organisation génomique du PPV ressemble à celle des parvovirus MVM et H-1, et plus particulièrement, dus aux sites d'épissage, aux CPV et FPV. Étant donné la similarité de l'organisation génomique du PPV aux autres parvovirus de vertébrés, le modèle décrit par Bergeron et collaborateurs (1993) peut également servir de modèle généralisé pour ces parvovirus.

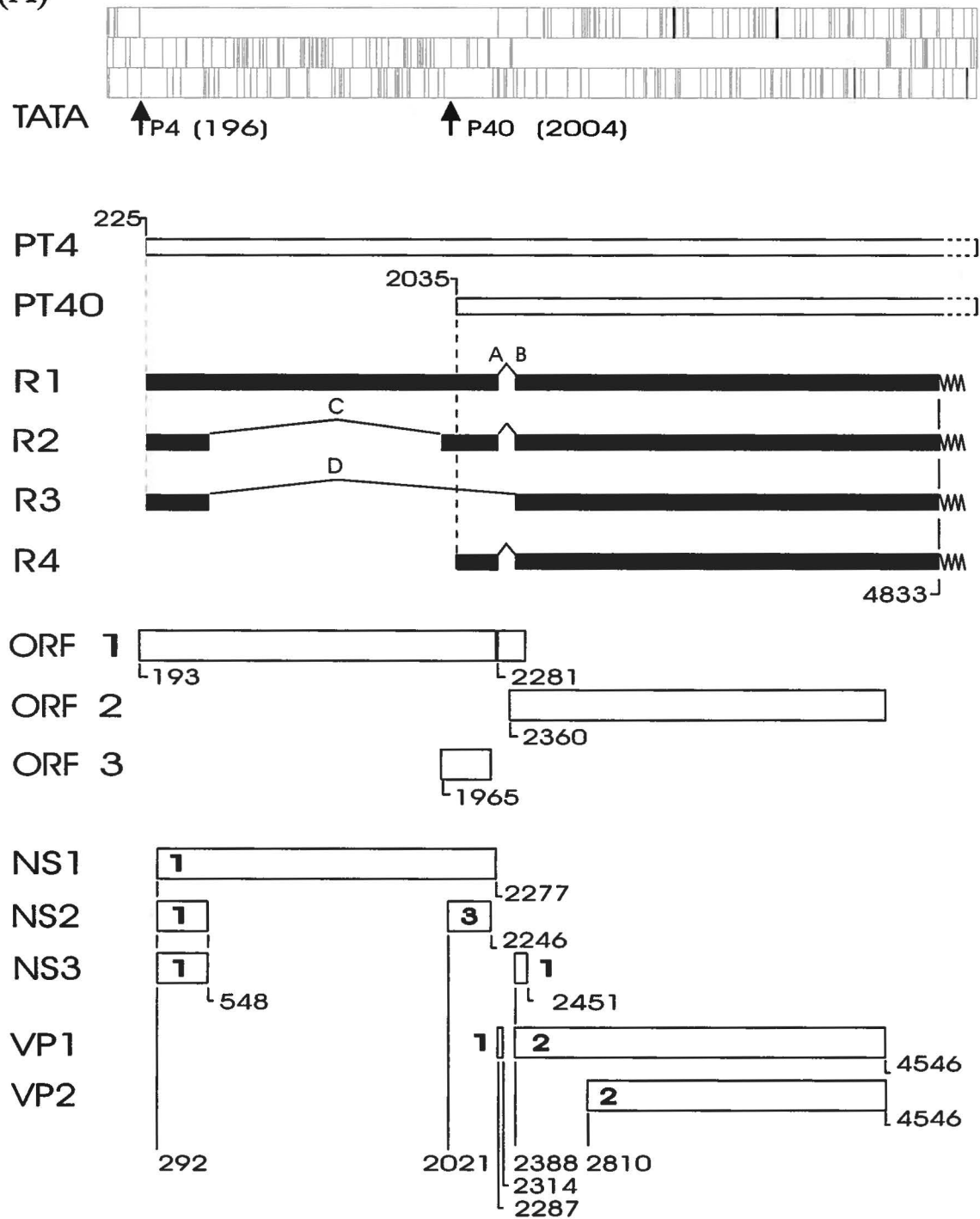
Le matériel génomique du PPV est utilisé de façon optimale dans le but de produire toutes les protéines virales nécessaires. Les gènes sont transcrits à l'aide de deux promoteurs (P4 et P40). Le transcrit primaire PT4 code pour les protéines non-structurales (gauche) tandis que le transcrit primaire PT40 code pour les protéines VP (droite). Il est important de mentionner que les protéines VP ont des cadres de lecture qui se chevauchent et que l'épissage alternatif dicte quelle protéine sera produite (figure 5). Un auto-assemblage des protéines VP1 et VP2, ou de la protéine VP2 seule, peut former la capside virale. Des capsides vides (sans ADN viral) peuvent également être produites *in vitro* dans un système d'expression hétérologue. Dans ce cas, ces particules sont nommées VLP pour Virus-like Particles ou "particules recombinantes vides". Nous reviendrons plus en détails sur les VLPs et leurs utilités à la section 4.

Figure 5: Schématisation de la réplication du génome du parvovirus porcin
(Tiré et adapté de Bergeron *et al.*, 1993)

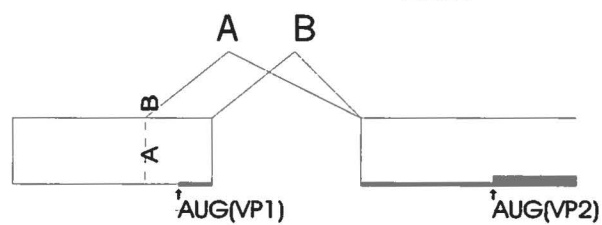
(A) Le brin de polarité positive (+) est représenté, ce brin est de même orientation que l'ARN messager. Deux transcrits primaires (PT4 et PT40) sont synthétisés du brin négatif (-) des nucléotides 225 et 2035 respectivement et sont clivés et polyadénylés à la position 4833. Quatre différents patrons d'épissage sont distingués résultant en transcrits de 4,7 kb (R1), 3,3 kb (R2), et 2,9 kb (R3 et R4). Ce ne sont pas tous les transcrits qui possèdent les patrons d'épissage A et B. En superposant les cadres de lecture ouverts (ORFs) des transcrits matures, trois produits de traduction NS et deux VP sont prédits (les chiffres correspondent au premier et dernier nucléotide de chaque exon et les chiffres à l'intérieur ou à côté de la boîte réfèrent au cadre de lecture).

(B) Différence des patrons d'épissage des protéines VP du parvovirus porcin. Les régions traduites sont représentées par des lignes en caractère gras.

(A) brin "+"



(B)



2.4 Souches du PPV

Parmi les sources où le PPV a été identifié on retrouve: les leucocytes porcins, les foetus momifiés, les tissus respiratoires porcins, le sperme de verrat, les lésions dermatiques chez le porcelet, les excréments diarrhéiques des porcs, et comme contaminant de culture cellulaire et de stocks viraux (revue par Molitor et Joo, 1990). Une liste des souches du PPV ainsi que la source initiale où elles ont été isolées se retrouvent au tableau 2.

2.4.1 Pathogénie

La voie d'infection par le PPV est principalement oro-nasale. La maladie survient lorsqu'une truie séronégative est infectée pendant la première moitié de la gestation et que le virus traverse la barrière placentaire. Le foetus meurt si le virus l'atteint avant qu'il devienne immuno-compétent, c'est-à-dire à environ 70 jours de gestation. S'il y a mort avant le 35ième jour de gestation, l'embryon dégénère et disparaît sans laisser de traces (résorption). Le foetus qui meurt après cette période est momifié ou mort-né. Normalement, le foetus infecté après le développement de l'immuno-compétence ne meurt pas et est mené à terme (Lager *et al.*, 1992).

La caractérisation moléculaire de quelques souches du PPV démontre une forte similarité de séquences parmi les génomes des souches virulentes et avirulentes (Bergeron *et al.*, 1996). Outre cette intime ressemblance au niveau génomique, les différentes souches du PPV peuvent être rassemblées en quatre groupes selon la pathogénie (tableau 3): souches non-pathogènes (KBSH et NADL-2), souches pathogènes pour les foetus non-immunocompétents menant à la mort foetale (exemple: NADL-8 et IAF-76), pathogènes aux foetus immunocompétents en association avec des dermatites (Kresse et IAF-A54) et des souches entériques.

Tableau 2: Différentes souches du PPV et la source initiale d'isolement
(Tiré et adapté de Molitor et Joo, 1990)

SOUCHE	SOURCE(S)
59e/63	Avortements, foetus momifiés
Wavre	Cultures cellulaires porcines
PRP	Tissus respiratoires porcins
PPV (G10/1)	Stocks viraux de choléra du porc
3020	Cochons normaux/anormaux
KBSH	Cellules KB humaines
87/Fs/1	Porcelets mort-nés
123T	Rhinite porcine
PVL-3	Cochons normaux/anormaux
NADL-8	Foetus momifiés
NADL-2	Leucocytes de porcs sains
PV-9	Oedème de porcelet
ADRI-1	Cultures cellulaires passées à basse température
HT-	Cultures primaires porcines
Kresse	Lésions vésiculaires
non nommé	Échantillons fécaux

Tableau 3: Différents groupes du PPV
(Tiré et adapté de Tijssen *et al.*, 1995)

Groupe	Souche(s)	Origine	Pathologie
#1	NADL-2/ KBSH	leuco. / cell. KB	non-pathogène
#2a	NADL-8 / IAF-22 IAF-3	foetus / thyroïde	pathogène pour les foetus non-immunocompétents
#2b	Kresse / IAF-A54	peau (dermatite)	dermatite & pathogène pour les foetus immunocompétents
#3	IAF-A83	intestinale	diarrhée

2.5 Tropisme et spectre d'hôte

Chez le PPV, le haut degré de similitude (97%) entre les souches Kresse et NADL-2 suppose que toute différence au niveau du tropisme doit correspondre à des différences minimales au niveau de leur génome. Les souches NADL-2 et Kresse n'ont que 5 a.a. différents à l'intérieur de la région codante VP1/VP2 (Bergeron *et al.*, 1996). Dans le but d'identifier les éléments génétiques responsables du tropisme de ces souches (et possiblement de la pathologie), les auteurs ont établi des systèmes cellulaires *in vitro* permettant de différencier la souche virulente de la souche vaccinale. Subséquemment, des clones infectieux chimériques des souches Kresse et NADL-2 furent utilisés afin d'identifier le déterminant allotropique situé dans la région VP1/VP2 (tableau 4). L'échange d'un fragment de restriction *Bgl* II entre ces souches mena le phénotype du génome cible à s'inverser par rapport à celui de la souche parentale du fragment *Bgl* II. Une prédiction de la localisation des différents acides aminés, en se basant sur le modèle du CPV, indique qu'ils sont tous localisés sur ou près de la surface externe du virion (figure 6).

2.5.1 Cartographie des résidus importants

Une extrapolation de la structure tri-dimensionnelle du CPV déterminée en cristallographie à rayons X, suggère que 4 des 5 a.a. différents sont localisés en surface. Le cinquième (**D378G**; **D**: Kresse et **G**: NADL-2) serait situé près de la surface. Les cinq a.a. différents des deux souches sont tous situés sur les boucles de surface. Le résidu **I215T** est positionné sur la boucle 2 (positionnement VP2), **D378G** et **H383Q**, sur les boucles 3 et 4, et **R565K** en position C-terminale. Trois des quatre résidus accessibles sont localisés (toujours par homologie avec la structure du CPV) à l'intérieur de la dépression de l'axe de symétrie d'ordre 2. Le résidu **P436S** est localisé au sommet de la protubérance de l'axe de symétrie d'ordre 3. Étant donné que ce résidu est situé sur la structure la plus exposée de la capsid, il pourrait être impliqué dans le tropisme.

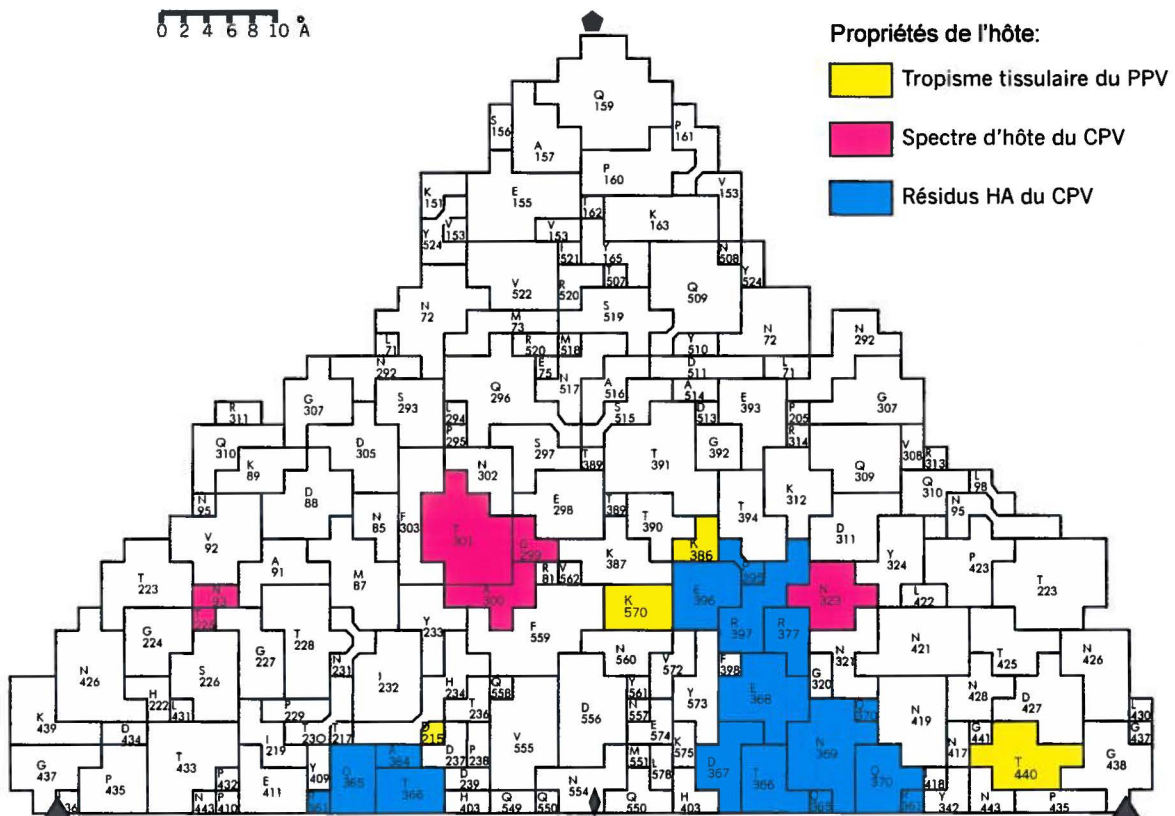
Tableau 4: Construction des clones infectieux chimériques du PPV
(Tiré et adapté de Bergeron *et al.*, 1996)

Des fragments *Bgl* II du génome des souches NADL-2 et Kresse ont été échangés entre elles. Les a.a. critiques sont indiqués. Ces clones infectieux ont été transfectés dans des cellules PT (clone de testicules de porc) et leur capacité de croître dans des cellules TV (culture primaire de testicules bovins), PT, et PFT (trompe de Fallope porcine) fut déterminée.

		Cellules		
		TV	PT	PFT
NADL-2		++	++++	+++
Kresse		—	+++	++
N2xBK		—	+++	++
KxBN2		++	+++	+++
				

Figure 6: Topologie de surface modifiée du CPV montrant une projection d'a.a. de surface accessibles au solvant d'une unité asymétrique de la particule icosaédrale (Tiré et adapté de Bergeron *et al.*, 1996)

Les résidus importants pour le spectre d'hôte et l'hémagglutination du CPV sont illustrés. La position des résidus impliqués dans le tropisme du PPV est également représentée par analogie au CPV.



3. RÔLES ET IMPLICATIONS DE LA STRUCTURE DES PARVOVIRUS

La capside des parvovirus offre bien plus qu'une protection au génome viral face à l'environnement qui l'entoure. En effet, la structure qu'elle déploie serait en quelque sorte une clé, celle-ci différente d'un parvovirus à l'autre, limitant ou permettant l'interaction avec différents organismes, voire même différents tissus d'un même organisme. Comme il pourra être constaté à la fin de cette section, le spectre d'hôte des parvovirus est fort complexe; il dépend non seulement de la souche virale mais aussi de la cellule ou de l'animal infecté. La capside gouverne principalement les différents spectres d'hôtes, néanmoins, des différences au niveau des gènes codants pour les protéines NS pour le minivirus de la souris (MVM) pourraient également jouer un rôle (revue par Truyen et Parrish en 1995).

Toutefois, ce sont les changements mineurs dans la séquence des protéines structurales (VP) qui influencent le plus la structure de la capside virale et qui peuvent altérer les propriétés biologiques fondamentales de ces virus.

3.1 Infection virale

Le tropisme cellulaire peut être restreint à différents niveaux: les récepteurs en surface cellulaire, le transport dans la cellule-hôte, la décapsidation, la réplication génomique et la synthèse des protéines virales, l'encapsidation et la sortie des virions. Des déterminants de l'allotropisme ont été identifiés au niveau de la capside virale pour plusieurs parvovirus. Ceux-ci sont constitués de quelques résidus pouvant agir à un ou plusieurs niveaux des différentes étapes de l'infection virale.

Les mécanismes d'entrée de plusieurs virus enveloppés sont assez bien caractérisés. Pour les virus non-enveloppés, ces mécanismes d'entrée dans une cellule-hôte sont loin d'être élucidés. La nature du récepteur des parvovirus ainsi que les procédés d'internalisation, de la décapsidation et des étapes précoces de la réplication virale sont peu connus. Cette section a pour but de faire le bilan des données acquises jusqu'à présent.

3.1.1 Récepteurs des parvovirus

Une infection dite “productive” est initiée par l’adsorption du virion à des récepteurs spécifiques en surface cellulaire. Pour la majorité des parvovirus, la nature exacte de ces récepteurs demeure énigmatique. Pour le MVM, des résidus de l’acide N-acétylneuraminique pourraient être les composants d’un dit “récepteur” car un traitement des cellules-hôtes à la neuraminidase empêche la liaison de ce virus (Stanick et Tattersall, non publié). De plus, un traitement des cellules à la trypsine prévient aussi la liaison du virus, ce qui suggère que ce récepteur pourrait impliquer une échine protéique. Le MVM a fréquemment entre 10^5 et 5×10^5 sites de liaison spécifiques par cellule (Linser *et al.*, 1977; Spalholz et Tattersall, 1983) suggérant que plusieurs types de protéines pourraient être impliqués.

Même si le tropisme cellulaire de plusieurs parvovirus ne serait pas régulé par des récepteurs spécifiques, il n’en reste pas moins que l’interaction initiale entre un parvovirus et sa cellule-cible est elle-même médiée par un récepteur spécifique. Plusieurs déterminants cellulaires identifiés peuvent servir de récepteur pour les parvovirus: une molécule de 40 à 42 kDa pour le CPV (Basak *et al.*, 1994); l’héparine sulfate protéoglycan pour l’AAV-2 (Summerford et Samulski, 1998); une molécule de 40 kDa dans le cas du PPV (Harding et Molitor, 1992). Dans tous ces cas, on ne peut pas conclure que l’absence de ces molécules empêche l’entrée du virus et l’infection. De plus, les auteurs n’excluent pas la possibilité de l’existence d’une deuxième molécule d’attachement.

Le récepteur le mieux caractérisé des parvovirus demeure sans contredit celui du parvovirus B19. Ce dernier est l’antigène P (globoside) et a été identifié par l’équipe de Brown (Brown *et al.*, 1993).

3.1.2 Récepteur et tropisme

Un récepteur cellulaire en surface est essentiel pour l'entrée virale et représente souvent le facteur qui restreint le tropisme de certains virus. Pour les parvovirus, par contre, la restriction ne se fait pas en surface cellulaire étant donné que ces virus peuvent aussi bien infecter des cellules permissives que non-permissives. Voici quelques exemples.

Le tropisme tissulaire restreint, observé pour deux souches bitropes du MVM envers des types cellulaires hétérologues, survient à un stade après l'adsorption des particules virales (Spalholz et Tattersall, 1983; Gardiner et Tattersall, 1988). Le déterminant gérant la différence de tropisme se situe au niveau de la région codant pour la VP2 (Ball-Goodrich et Tattersall, 1992). Une restriction au niveau de la réplication du PPV en cellules non-permissives a également été démontrée comme étant un phénomène survenant après l'adsorption car ce virus semble se lier aussi bien aux cellules permissives qu'aux cellules non-permissives (Oraveerakul *et al.*, 1993). Toujours dans le même ordre d'idées, le CPV et le FPV démontrent également un spectre d'hôte défini qui, encore une fois, est géré par les gènes de la capside et qui ne serait pas défini par la présence ou l'absence d'un récepteur (Parrish, 1991; Chang *et al.*, 1992).

Malgré le fait que le tropisme cellulaire de différents parvovirus ne semble pas être gouverné par un récepteur cellulaire spécifique, il n'en demeure pas moins que l'interaction initiale entre un parvovirus donné et sa cellule-cible est médiée par un récepteur spécifique et que certaines cellules qui ne sont pas dotées du récepteur sont tout simplement résistantes à l'infection.

3.1.3 Étapes précoces de l'infection

Contrairement à d'autres modèles viraux, le mécanisme d'entrée des parvovirus est très peu connu, outre le fait que ces derniers s'acheminent dans le cytoplasme des cellules permissives et non-permissives. Après l'attachement du virus, ce dernier est internalisé via des vésicules non tapissées de clathrine (Basak et Turner, 1992). Dans le cas du CPV, l'entrée implique le transport endocytaire à de bas pH (Basak et Turner, 1992). Grâce à des travaux de Vihinen-Ranta et ses collaborateurs (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998), il a été permis d'affirmer que le réseau endocytaire à faible pH est nécessaire mais non suffisant pour que le CPV initie une infection fructueuse. Outre les changements de conformations hypothétiques que subit le virion en milieu acide, il peut aussi y avoir des changements conformationnels au niveau des protéines de la capside causés par d'autres facteurs comme une interaction avec des déterminants cellulaires de surface ou des déterminants intracellulaires. La structure des parvovirus joue donc un grand rôle dans le tropisme, le spectre d'hôte, l'immunité, etc.

3.2 Rôles de la structure des parvovirus

Ce n'est qu'au cours de cette dernière décennie que la structure tri-dimensionnelle de plusieurs parvovirus (CPV/FPV, MVM, B19, et plus récemment le *GmDNV*) a été déterminée en cristallographie à rayons X presque en totalité par l'équipe du docteur Michael Rossmann (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1993; Wu et Rossmann, 1993; Llamas-Saiz *et al.*, 1996; Xie et Chapman, 1996; Agbandje *et al.*, 1998; Simpson *et al.*, 1998). Toutes ces structures démontrent une capside de symétrie icosaédrale T=1 formée de 60 protomères (majoritairement VP2 et VP3).

3.2.1 Structure antigénique de la capside

La cartographie antigénique des parvovirus a été réalisée grâce aux mutants échappatoires, au balayage peptidique (“peptide scanning”), à la production et à l’expression des protéines structurales entières ou tronquées dans différents systèmes d’expression, mais surtout grâce aux données sur la structure tri-dimensionnelle.

Dans la structure du CPV et du FPV, il existe deux dépressions: un “canyon” à proximité de chaque axe de symétrie d’ordre 5 et une fossette (“dimple”) encerclant l’axe de symétrie d’ordre 2. Entre ces deux composantes en surface, il existe un cercle caractérisant un présumé site d’attachement d’un récepteur, deux sites d’anticorps neutralisants et (près de la dépression) une boucle (a.a. 356 à 375), probablement associée à la propriété hémagglutinante de ces virus (Agbandje *et al.*, 1993). D’autres sites antigéniques neutralisants ont été caractérisés en surface du CPV et du FPV, en utilisant l’analyse de mutants échappatoires et la cartographie peptidique (Rimmelzwaan *et al.*, 1990; Lopez de Turiso *et al.*, 1991; Cortis *et al.*, 1993; Langeveld *et al.*, 1993; Strassheim *et al.*, 1994). L’antigénicité des parvovirus est de prime abord associée aux boucles exposées de grande variabilité de séquence. Les a.a. qui siègent dans le canyon sont très conservés, mais pourraient avoir une fonction autre que la liaison avec un récepteur. Les résidus importants pour la spécificité cellulaire des parvovirus et pour l’attachement aux érythrocytes sont dispersés à proximité de la jante (“rim”) d’une dépression, moins conservée celle-ci, près de l’axe de symétrie d’ordre 2, et sur l’épaule de la pointe à l’axe de symétrie d’ordre 3.

Les travaux réalisés au laboratoire du docteur Colin Parrish ont démontré que la proximité du site d’hémagglutination et de celui des déterminants du tropisme pouvait suggérer que la cellule-hôte ainsi que les récepteurs d’érythrocytes se lieraient au même site viral.

Il est important de retenir que les régions de prédominance antigénique sont aussi celles qui sont les plus accessibles. Ces résultats suggèrent aussi qu'il y a une forte relation entre la variabilité séquentielle et antigénique des picornavirus (Rossmann et Palmenberg, 1988). Il fut donc proposé qu'un besoin d'évader à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte pouvait maintenir une forte pression sélective pour des changements de séquences au niveau des boucles exposées.

3.2.2 Implication antigénique de la portion N-terminale des protéines structurales

L'équipe de Cotmore et Tattersall (1999) a démontré que la portion N-terminale de la VP2 du MVM(i), correspondant à la région polyglycine très conservée, s'étalait au travers d'un canal cylindrique le long de chaque axe de symétrie d'ordre 5 et que cette dernière était impliquée dans l'antigénicité. Possiblement qu'une portion N-terminale de la VP2 sur 5 est située à l'extérieur de la capsid et est accessible au clivage protéolytique pour former la protéine VP3. Ce clivage *in vivo* survient au moment de l'entrée du virus dans la cellule-cible. L'exposition en surface de la partie N-terminale de la VP2 pourrait être analogue à l'exposition de la protéine mineure de la capsid, la VP4, des picornavirus après l'attachement du virus et la décapsidation. Des épitopes localisés au niveau de la région N-terminale de la VP1 peuvent également interagir avec des anticorps neutralisant le CPV (Rimmelzwaan *et al.*, 1990; Lopez de Turiso *et al.*, 1991; Langeveld *et al.*, 1993). La partie N-terminale de certaines VP sort des sommets d'ordre 5 et expose ainsi des a.a. N-terminaux de la VP2 (1 à 32) libres d'interagir avec les anticorps. Pour le PPV, l'équipe de Kamstrup a tout d'abord conclu que la portion N-terminale de la VP2 était impliquée dans la neutralisation virale (Kamstrup *et al.*, 1998). Les travaux effectués sur le B19, le CPV, le MVM, appuient tous l'hypothèse que le domaine N-terminal de la protéine VP2 des parvovirus représente un site privilégié pour l'attachement d'anticorps neutralisants, et qu'il doit être considéré lors du développement de vaccins. Pour le PPV, par contre, bien qu'une étude visant à mieux connaître la structure antigénique de ce virus ait été amorcée par l'équipe de Kamstrup en 1998, les résultats ne sont toujours pas concluants. Pour le PPV, le

tropisme *in vitro* semble être influencé par quelques acides aminés en surface. Par contre, des déterminants importants impliqués dans la réponse immunitaire ou dans l'interaction du virus avec les cellules de l'hôte demeurent encore inconnus. L'identification de ces déterminants en conjonction avec l'obtention de la structure tri-dimensionnelle du PPV permettront de mieux comprendre les stratégies qu'emploie ce virus pour interagir avec son environnement.

3.3 Conclusion

Les déterminants du tropisme tissulaire ou cellulaire de plusieurs parvovirus, ainsi que ceux qui influencent le spectre d'hôte et les propriétés hémagglutinantes, ont tous été localisés à l'intérieur des protéines VP (revue par Truyen et Parrish, 1995). Des études "carto-génétiques" utilisant des clones recombinants de deux types de MVM ont permis de localiser le déterminant du tropisme fibroblastique du MVM(p) à une région localisée entre les nucléotides 3522 et 3757 dans le cadre de lecture codant pour la protéine VP2 des gènes de la capsid (Gardiner et Tattersall, 1988). Le groupe de Tattersall a également isolé un mutant de la souche MVM(i) qui était capable de se propager dans des fibroblastes murins. La mutation était située au même endroit du déterminant fibrotropique du MVM(p) mentionné ci-haut. Le mutant consistait en deux changements en a.a dans la région commune VP1/VP2 des protéines de la capsid.

De façon intéressante, Parrish et Carmichael (1986) ont eux-mêmes isolé et cartographié un mutant qui, suite à des passages successifs dans des cellules d'origine, avait perdu l'habileté de se propager sur les cultures cellulaires canines. Cette mutation se situait dans la région du génome du CPV codant pour le gène de la capsid, équivalente à celle qui comprenait les deux changements radicaux entre MVM(p) et MVM(i) mentionnées ci-haut. Ces résultats suggèrent fortement que les protéines de la capsid jouent un rôle dans la spécificité des cellules-cibles du virus.

Des déterminants allotropiques ont été identifiés pour plusieurs parvovirus: CPV, FPV, MVM, ADV, et le *GmD*NV. Afin d'identifier des déterminants, plusieurs méthodes ont été utilisées dont les clones infectieux et l'échange de fragments génétiques entre différentes souches pour produire des virus "chimères" ayant de nouvelles propriétés. La majorité des expériences réalisées ont permis de conclure que le tropisme de ces virus est dicté par de minimes changements au niveau de la séquences des VP et souvent, ces changements se traduisent en 2 ou 3 a.a. critiques importants pour un tropisme donné. Ces acides aminés critiques sont le plus souvent qu'autrement situés en surface de la capsid et plus spécifiquement près ou sur la protubérance ("spike") sur l'axe de symétrie d'ordre 3 pour les parvovirus des vertébrés. Comme nous l'avons vu, ce tropisme ne serait pas médié par des récepteurs spécifiques en surface des cellules mais par des interactions avec des composantes intra-cellulaires.

4. PARTICULES VIRALES RECOMBINANTES VIDES (VLPs)

4.1 Définition

Lorsque les protéines de la capsid de certains parvovirus sont produites dans un système d'expression hétérologue, elles peuvent s'auto-assembler et former des capsides recombinantes vides (non-infectieuses) appelées "virus-like particles" (VLPs). Dans la majorité des cas, ces particules recombinantes sont identiques aux parvovirus sauvages tant au niveau antigénique qu'au niveau immunologique (Kajigaya *et al.*, 1991; Lopez de Turiso *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1992; Saliki *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1994). Différentes VLPs ont été obtenues pour de nombreux virus différents; par exemple; le poliovirus (Urakawa *et al.*, 1989), le virus de la fièvre catarrhale des moutons (French *et al.*, 1990) et le rotavirus (Redmond *et al.*, 1993). L'assemblage de ces particules permet non seulement une étude de la morphogénèse virale, mais ces structures peuvent aussi servir de nouveaux vaccins. Ces vaccins offrent comme avantages, entre autres: (i) l'élimination des réservoirs viraux utilisés dans la préparation des vaccins conventionnels, (ii) la prévention d'une

éventuelle épidémie due à une évasion virale pendant la production de vaccins et (iii) de faciliter l'éradication des maladies.

Les VLPs peuvent également servir de plate-forme pour la présentation d'épitopes. Les particules vides du poliovirus furent les premières à être utilisées à cette fin. Ces particules chimériques du poliovirus, présentant des épitopes de virus étrangers, peuvent induire une réponse humorale chez les animaux inoculés (Altmeyer *et al.*, 1991; Vella *et al.*, 1991). D'autres particules provenant d'autres virus ont également été utilisées: virus de l'hépatite B (Clarke *et al.*, 1990); le rotavirus (Tosser *et al.*, 1992); et le parvovirus (Miyamura *et al.*, 1994; Sedlik *et al.*, 1997; Lo-Man *et al.*, 1998; Sedlik *et al.*, 1999), pour ne nommer que ceux-là. Dans tous ces cas, il y avait sollicitation de la réponse immunitaire spécifique à l'épitope présenté.

4.2 Systèmes d'expression

Les critères d'évaluation d'un système de production de protéines recombinantes sont multiples. Premièrement, l'utilisation d'un vecteur d'expression nécessite que celui-ci soit stable, que son nombre de copies soit élevé et que son promoteur soit fort et régulable. Deuxièmement, il faut que les cellules hôtes soient capables de se multiplier à de hautes densités. Le temps de génération et le coût du milieu de culture doivent aussi être considérés. Finalement, le taux d'expression, la qualité, la facilité d'extraction et la purification de la protéine recombinante obtenue doivent également être intéressants. En général, un système qui répond à plusieurs de ces critères est un système avantageux.

Plusieurs systèmes d'expression hétérologues ont été utilisés pour la production de particules virales recombinantes: *Escherichia coli* (*E. coli*), le virus recombinant de la vaccine, le baculovirus recombinant et les levures.

Dans le cas des parvovirus, le système d'expression de la bactérie *E. coli* a tout d'abord été utilisé. Étant donné que le virus B19 ne pouvait être produit en quantité suffisante en culture cellulaire, un fragment du génome de ce virus a été exprimé dans *E. coli* pour des fins de diagnostique (Morinet *et al.*, 1989). Ce système offrait un rendement très bas et produisait souvent des fragments tronqués (Rayment *et al.*, 1990). Des capsides du B19 furent tout d'abord produites dans des cellules ovariennes du hamster chinois modifiées génétiquement (Kajigaya *et al.*, 1989). Le rendement était peu élevé. Jusqu'à maintenant, aucun article scientifique ne fait état de la production de VLPs des parvovirus dans le système *E. coli*. Probablement que l'absence de protéines chaperones importantes rendent la formation de capsides très difficile.

Le virus de la vaccine a été utilisé pour l'expression de protéines hétérologues (revue par Hruby, 1990). Des poxvirus recombinants contenant des gènes viraux étrangers ont été utilisés avec succès dans des études en regard de la réponse immunitaire de l'hôte, et dans certains cas, la vaccination avec ces virus résultait en une protection contre l'infection virale (Tartaglia *et al.*, 1990; Moss, 1991). Ce système a d'ailleurs été utilisé par l'équipe de Clemens pour produire des capsides recombinantes du parvovirus du vison (ADV) qui étaient antigéniquement similaires aux capsides natives (Clemens *et al.*, 1992).

Le système du baculovirus a également été utilisé pour exprimer de grandes quantités d'antigènes viraux dans des cellules d'insecte, sans doute parce que les modifications post-traductionnelles sont très similaires à celles ayant lieu dans des cellules des mammifères (Luckow et Summers, 1988). Un nombre important de structures virales vides ont été obtenues pour différents virus en utilisant des vecteurs baculovirus, comme par exemple: le virus de l'hépatite B, le rotavirus, le poliovirus et le virus de la fièvre catarrhale du mouton (cités par Martinez *et al.*, 1992). C'est d'ailleurs le système d'expression de choix des VLPs des parvovirus (PPV, B19, MEV, CPV et mDPV) qui ont toutes été produites par ce système (Brown *et al.*, 1991; Lopez de Turiso *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1994; Le Gall-Reculé *et al.*, 1996). Dans tous ces cas, les particules recombinantes vides

étaient structurellement et antigéniquement semblables aux particules natives. Les bons taux d'expression de ce système ont permis d'isoler de grandes quantités de capsides vides pour l'étude cristallographique à rayons X de plusieurs parvovirus et pour servir de modèle dans l'étude des mécanismes d'assemblage de la capside.

Même si certaines VLPs peuvent être produites dans *E. coli* ou dans des cellules d'insectes, le système d'expression de la levure est sans doute le plus avantageux car: (i) il est bien reconnu en biotechnologie pour générer des produits à des fins médicales; et (ii) ce système est exempt de toxines dangereuses pour l'homme. Les systèmes d'expression du baculovirus et du virus de la vaccine sont dispendieux et requièrent des manipulations laborieuses afin d'augmenter le niveau de production des VLPs. Un système d'expression utilisant la levure est une alternative intéressante: il a le potentiel de produire de grandes quantités de protéines conservant leur conformation native; c'est un système qui possède l'appareillage nécessaire pour la maturation des protéines. Des produits dérivés de la levure sont déjà utilisés, comme par exemple: le vaccin contre l'hépatite B. Ce système a permis la production de VLPs, notamment pour les papillomavirus de type 6, 6a et 16 (Hofmann *et al.*, 1995; Sasagawa *et al.*, 1995) et pour le polyomavirus (Sasnauskas *et al.*, 1999). Ce système d'expression peut être applicable à d'autres virus pour la production de particules vides et pour l'analyse des protéines de structure.

4.3 *Pichia pastoris*

Beaucoup de protéines hétérologues ont été produites en grande quantité par la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*). Cette espèce est particulièrement populaire car elle est connue par les biologistes moléculaires. La génétique et la physiologie de cette levure sont bien documentées. Même si *S. cerevisiae* a été utilisée pour la production de nombreuses protéines eucaryotes hétérologues, ce système a ses limites. Le rendement se maximise à environ 1 à 5 % des protéines totales de cette levure. La présence d'un gène étranger ajoute un stress à la cellule. La production d'une protéine étrangère pendant la phase de croissance ralentit cette dernière. L'instabilité est particulièrement élevée quand

la protéine produite est toxique pour la levure et une production à grande échelle est parfois difficile. Pour pallier à ces problèmes, les chercheurs se sont tournés vers d'autres espèces.

Une des alternatives fut la levure *Pichia pastoris*. C'est une levure méthylotrophe qui croît dans des conditions relativement semblables à *S. cerevisiae*. Cette levure possède un promoteur fort, inductible au méthanol, pouvant être utilisé pour la production de protéines recombinantes. Elle est capable d'apporter des modifications post-traductionnelles semblables à celles des eucaryotes plus évolués. Les niveaux d'expression sont élevés: jusqu'à 12 g/L (Clare *et al.*, 1991). La plupart des protéines sont exprimées à des niveaux plus élevés que ceux rencontrés avec les systèmes d'expression d'*E. coli*, les cellules d'insectes et les cellules de mammifères. *Pichia pastoris* s'adapte facilement à une production à grande échelle de protéines hétérologues. Ce système offre également l'avantage d'être peu coûteux.

5. BANQUES PEPTIDIQUES EXPOSÉES EN SURFACE DE PHAGES

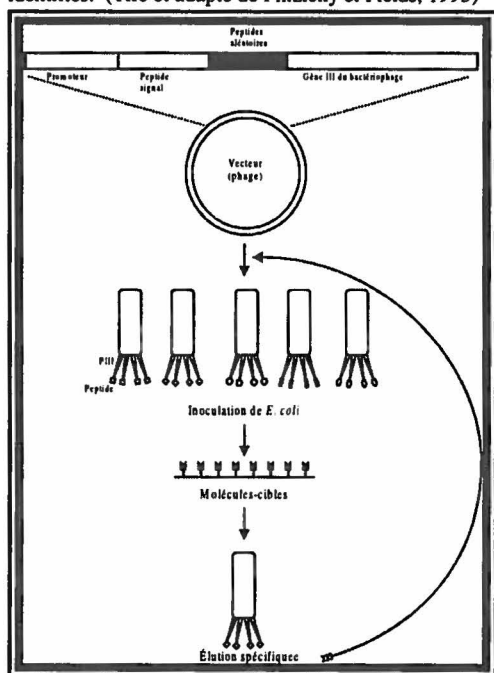
5.1 Principes et méthodes

Le docteur Smith fut le premier à démontrer qu'un bactériophage pouvait exprimer à sa surface un peptide étranger fusionné à une protéine de la capsid (Smith, 1985). Smith suggéra qu'une librairie de ces phages de fusion pouvait être construite et criblée afin d'identifier des peptides pouvant se lier à une molécule-cible. Au cours des dernières années, le développement de cette technologie a permis son application à une variété d'interactions protéine-protéine ou protéine-peptide.

Les bactériophages filamenteux tel le M13, fd, et f1 ont approximativement 5 copies de la protéine de la capsid (codé par le gène III) à leur surface. Donc, lorsqu'une séquence d'ADN exogène est insérée dans ce gène, de multiples copies de la protéine de fusion sont exposées en surface. Ceci est appelé un affichage polyvalent. De la même façon, la protéine majeure de la capsid, codée par le gène VIII, peut aussi afficher un insert étranger.

Cette dernière permet d'obtenir jusqu'à 2700 copies de l'insert par phage. Généralement, l'affichage polyvalent est limité à de petits peptides car de plus grands inserts interfèrent avec les fonctions des protéines de la capsid et le phage devient peu infectieux.

Figure 7: Librairie peptidique d'un vecteur de bactériophage. Cette figure illustre le "panning", par lequel des peptides qui se lient à une molécule-cible sont identifiés. (Tiré et adapté de Phizicky et Fields, 1995)



Des séquences aléatoires peuvent être insérées au gène III ou au gène VIII pour créer une librairie de phages de fusion (figure 7). Cette librairie peut ensuite être criblée afin d'identifier un phage spécifique qui affiche toute séquence pour laquelle il y a un "partenaire de liaison", comme un anticorps, par exemple. Ce criblage est réalisé au moyen d'une série de purifications par affinité mieux connues sous le nom de "panning". Les phages spécifiques se lient à une molécule-cible qui est immobilisée sur une plaque de plastique. Des lavages permettent d'éliminer les phages non spécifiques. Les phages spécifiques sont élués et utilisés pour infecter *E. coli*. Chaque cycle amène un enrichissement de l'ordre de 10^3 phages spécifiques, ce qui a donc pour conséquence

qu'après quelques rondes d'amplification, le séquençage en ADN des phages de forte affinité révèle qu'un nombre restreint de séquences nucléotidiques. En plus d'être hautement sélectif, ce système offre également l'avantage de construire de vastes banques de phages (une librairie peut contenir jusqu'à 10^{15} séquences peptidiques différentes). De plus, le lien direct entre la protéine de fusion et son gène, dans un phage donné, permet de connaître immédiatement les données nucléotiques afin de générer un ou plusieurs consensus de séquences de phages spécifiques. Finalement, le phage peut être directement utilisé afin de connaître la spécificité de liaison de la protéine de fusion en faisant varier la rigueur des lavages utilisés dans les cycles d'amplification.

5.2 Applications

Des banques peptidiques exposées en surface de phages ont été utilisées avec succès à de nombreuses fins, incluant la cartographie d'épitopes/le développement de vaccins (revue par Cortese *et al.*, 1995), l'identification de substrats de la protéine kinase/ligands SH2 (Dente *et al.*, 1997), et l'identification de peptides "imitateurs" de ligands non-peptidiques (Katz *et al.*, 1995). Une application notable est sans doute l'identification de nouveaux peptides bio-actifs par sélection envers des récepteurs cellulaires de surface immobilisés (Wrighton *et al.*, 1996; Cwirla *et al.*, 1997). Somme toute, cette technologie permet l'identification rapide d'une interaction entre un peptide d'une banque peptidique et une molécule-cible (anticorps, enzymes, récepteurs, etc) sans avoir aucune connaissance de l'essence même de l'interaction.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1. CELLULES

1.1 Origine des cellules

Une lignée cellulaire de testicules de porcs (PT) a été utilisée tout au long des expériences de production virale et d'immunofluorescence.

1.2 Culture cellulaire

Les cellules ont été cultivées dans un milieu constitué de "Dulbecco's Modified Eagle Medium" (DMEM) (GibcoBRL, New York, NY, USA) enrichi d'un cocktail d'antibiotiques pénicilline/streptomycine 5 % (v/v) (GibcoBRL), de 2 mM de L-glutamine (GibcoBRL), et de 7 % (v/v) de sérum foetal bovin (FBS) (Wisent Inc., USA), inactivé préalablement pendant 30 minutes à 56°C.

Les feuillets cellulaires confluents étaient rincés avec 0,01 M de tampon phosphate salin stérile (PBS) (Service de Biotechnologie cellulaire, INRS-IAF, Laval, Canada) et dispersés à l'aide d'une solution de trypsine TRL à 0,01 % (p/v) (Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, USA) et 0,04 % (p/v) de EDTA (GibcoBRL).

2. MATÉRIEL INFECTIEUX

2.1 Virus

La souche parvovirale Kresse fut initialement obtenue du docteur M.C. Frey (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IO, USA), tandis que la souche parvovirale NADL-2 provenait de l'American Type Culture Collection (ATCC VR-742). La production virale sur des cellules de trompes de Fallope de porc (PFT), ou en cellules PT, fut assurée par le docteur Zoltán Zádori du laboratoire du professeur Peter Tijssen (INRS-IAF, Laval, Canada).

2.2 Clones infectieux PPV

Les formes répliquatives de l'ADN viral des souches Kresse et NADL-2 ont été clonées séparément dans des vecteurs pour produire des clones infectieux (Bergeron *et al.*, 1993 et 1996). Le clone recombinant p17 provenait de l'insertion de la molécule RF de la souche NADL-2 du PPV, traitée pour présenter des extrémités franches, dans le plasmide pUC19. Le clone recombinant pKR1, lui, provenait de l'insertion de la souche Kresse du PPV dans le plasmide pBluescript II KS-. Ces clones ont été utilisés comme gabarits pour les réactions de polymérase en chaîne (PCR) afin d'amplifier de l'ADN codant pour la protéine structurale VP2 du PPV.

3. ANTICORPS MONOCLONAL ET POLYCLONAUX PORCINS

3.1 Hybridome 3C9-D11-H11

Un hybridome sécréteur d'un anticorps monoclonal neutralisant (3C9-D11-H11) produit contre le PPV a été obtenu à partir de l'ATCC (CRL-1745) (Katz et Van Deusen, 1985).

3.2 Culture du 3C9-D11-H11

La suspension cellulaire a été maintenue à environ 1×10^5 cellules/ml dans du milieu DMEM additionné de 4,5 g/l de glucose à 92,5 % (v/v), de sérum équin à 5 % (v/v) (GibcoBRL), et de sérum foetal bovin à 2,5 % (v/v) (Wisent, USA). La suspension cellulaire a été passée tous les deux à trois jours (dilution 1 dans 4 dans du milieu de culture frais).

3.3 Anticorps polyclonaux porcins

Différents anticorps polyclonaux porcins provenant de sérums d'un cheptel porcin ont été utilisés pour les expériences de détection en microscopie à fluorescence. Ces sérums étaient une gracieuseté de la compagnie Speywood Laboratory Limited (Maidenhead, UK).

4. IMMUNOFLUORESCENCE

Des cellules PT ont été cultivées dans des flacons de culture tissulaire en polystyrène de 150 mm³ (Corning®, Cambridge, MA, USA) jusqu'à l'obtention d'une confluence d'environ 80 % du feuillet cellulaire. Par la suite, les cellules ont été récoltées par trypsinisation et environ 2×10^4 cellules ont été déposées dans les puits d'une micro-plaque de culture Costar® (Corning, Corning, NY, USA). Les cellules ont ensuite été incubées environ 4 heures à 37°C. Différentes concentrations virales ont été utilisées pour inoculer les cellules dans un volume d'environ 50 µl par puits. Les cultures ont ensuite été incubées 1 heure à 37°C pour permettre l'adsorption du virus et l'infection. L'inoculum a été enlevé, 150 µl de milieu de culture frais a été ajouté et les cultures ont été incubées à 37°C pendant 24 heures.

La fixation des cellules et l'ajout des anticorps se sont fait selon le protocole d'immunofluorescence de Li et collaborateurs (Li *et al.*, 1996). Les cellules infectées ont été fixées pendant 30 minutes à la température de la pièce, sur la surface de plastique, avec un tampon d'immunofluorescence (tampon phosphate pour IF, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-la-Coquette, France) comprenant 3 % (v/v) de formaldéhyde. Par la suite, les cellules ont subi un traitement au tampon IF avec 3 % (v/v) Triton X-100 dans les mêmes conditions. Après un lavage avec du PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 (surnageant de culture dilué 30 fois dans du tampon IF). Le tout a été incubé de 40 à 60 minutes. Par la suite, les feuillets cellulaires ont été lavés 3 fois avec du PBS et incubés dans les mêmes conditions avec un anticorps monoclonal anti-souris Ig couplé à la fluorescéine (Boehringer Mannheim, Montréal, Québec, Canada) dilué 1000 fois dans du

tampon IF. Après deux lavages au PBS, les cellules ont été visionnées en microscopie à fluorescence à l'aide du microscope Nikon Eclipse, modèle E800 (Nikon Canada Instruments Inc., Montréal, Québec, Canada).

5. PCR SUR CLONES PPV INFECTIEUX

5.1 Amplification de l'ADN

Des réactions de PCR ont permis l'amplification du gène codant pour la protéine VP2 de la souche Kresse et de la souche NADL-2 du PPV (figure 8). Dans un microtube pour PCR, ont été ajoutés: 1 µl (250 pg) d'ADN du clone p17 ou pKR1, 1,5 µl de tampon Expand™ 10X (Boehringer Mannheim), 15 mM de MgCl₂ et 44 µl d'eau distillée (stérile). Le mélange réactionnel a ensuite été déposé dans un thermocycleur (TC1, Perkin Elmer, Montréal, Québec) et a été chauffé à 95°C pendant 5 minutes (départ "hot start") puis maintenu à 80°C pendant 10 minutes. Ensuite, ont été ajoutés: 5 µl de tampon Expand™ 10X, 0,5 µl de l'amorce VP2-ACP (50 pmol/µl), 0,5 µl de l'amorce VPR-ACP (50 pmol/µl), 1 µl de dNTP (10 mM), 45 µl d'eau stérile et 1,2 unités (U) de polymérase Expand™ (mélange de *Taq* polymérase et *Pwo* polymérase). Le mélange réactionnel a été soumis au programme d'amplification suivant: dénaturation de 1 minute à 94°C, 30 secondes à 38°C pour permettre l'appariement des amorces et 3 minutes à 68°C pour permettre la synthèse de l'ADN. Ce cycle a été répété quatre fois. Par la suite, un second cycle: 1 minute à 94°C, 30 secondes à 51°C et 3 minutes à 68°C, a été répété 28 fois. Finalement, une élongation de 10 minutes à 72°C a permis d'allonger les brins incomplets d'ADN nouvellement synthétisés.

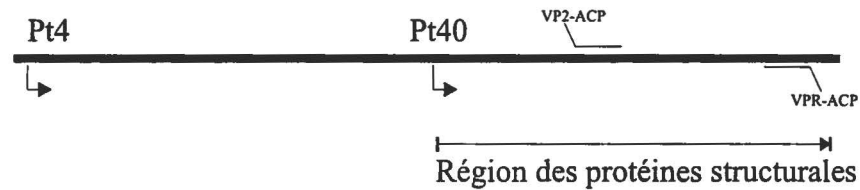
Figure 8: Stratégies d'amplification de la région codante pour la protéine VP2

(A) Sites du génome du PPV où les amorces de PCR s'apparient dans la région codant pour les protéines structurales.

(B) Les amorces VP2-ACP et VPR-ACP (en caractères gras) ont été construites en fonction d'obtenir les sites de restriction reconnus par les enzymes *Bam*H I et *Eco*R V afin de permettre un clonage directionnel dans le vecteur de transfert pUCBM20. Les régions complémentaires du génome du PPV sont également représentées. Les sites *Kpn* I et *Xba* I ont été utilisés ultérieurement pour le clonage du gène dans le vecteur d'expression pPICZB (section 7). À noter que quelques nucléotides en aval du codon d'initiation (ATG) ont été modifiés afin de produire un consensus Kozak.

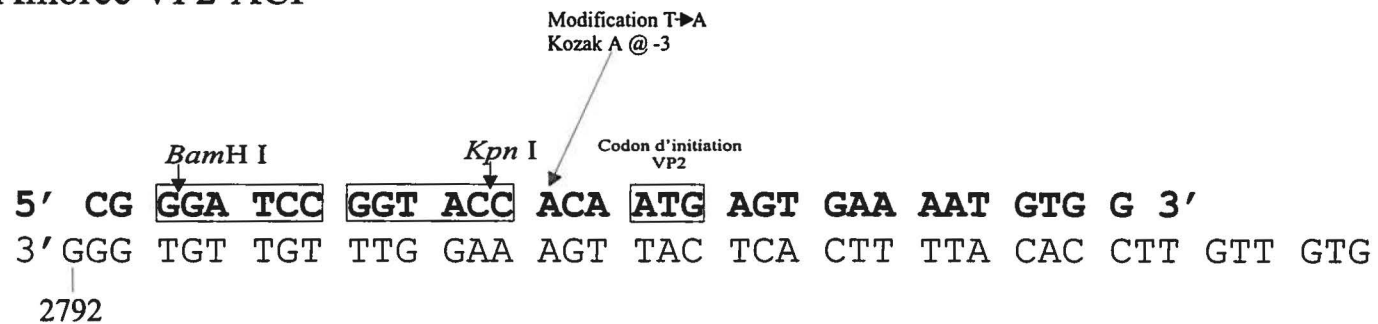
(A)

Génome du PPV

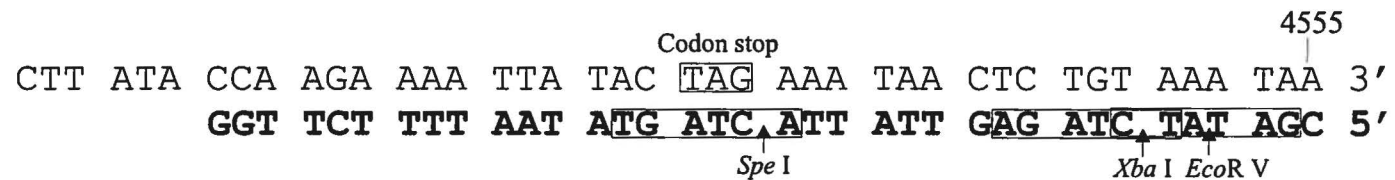


(B)

Amorce VP2-ACP



Amorce VPR-ACP



5.2 Analyse des produits de PCR

Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) (GibcoBRL) préparé dans du tampon TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,114% [v/v] d'acide acétique glacial). Le dixième (10 µl) des produits de PCR a été ajouté à 2 µl de tampon de chargement 6X (0,25% [p/v] bleu bromophénol, 0,25% [p/v] xylène de cyanol FF et 30 % [v/v] de glycérol) puis chargé sur le gel. La migration du gel a été réalisée à 80 volts pendant 1 heure (source d'alimentation électrique modèle 250/2,5 de Bio-Rad, Mississauga, Ontario, Canada). Le gel d'agarose a été coloré pendant 20 minutes dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml. Le gel a été visionné sous rayons ultra-violets. Une photographie du gel a été prise (film Polaroid 667).

6. CLONAGE DES PRODUITS DE PCR

6.1 Extraction des produits de PCR sur gel d'agarose

Afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN amplifié pour réaliser le clonage, les produits de PCR ont été chargés sur un gel préparatif d'agarose 1,2 % (p/v). Le gel d'agarose a été coloré pendant 10 minutes dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml. Les bandes d'ADN de la taille désirée ont été visionnées sous rayons ultra-violets à hautes longueurs d'ondes, pour ne pas endommager l'ADN, et taillées sur le gel. L'ADN a été extrait du gel à l'aide de la trousse "GENECLEAN®" (BIO 101 Inc., Vista, CA, USA). L'éluat final (contenant l'ADN amplifié et purifié) était de 10 µl. L'ADN a ensuite été quantifié sur gel d'agarose 1% (p/v).

6.2 Digestion enzymatique du vecteur et de l'ADN purifié

Le vecteur de transfert pUCBM20 a été utilisé pour le clonage du gène codant pour la protéine VP2 du PPV (figure 9). Ce plasmide est un dérivé des plasmides pUC18/19. Ce vecteur à copies multiples possède le gène de résistance à l'ampicilline. De plus, les colonies de clones recombinants peuvent être identifiées par sélection bleu/blanc grâce au gène lacZ.

La première étape a été de rendre cohésives les extrémités du vecteur et du produit de PCR dans le but de réaliser un clonage directionnel. Brièvement, 1 µg du produit de PCR purifié et 3 µg de vecteur ont été digérés séparément à l'aide de 10 U de l'enzyme *Bam*H I et 10 U de l'enzyme *Eco*R V dans 2 µl de tampon React 3 10X (500 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM MgCl₂, 1M NaCl) (GibcoBRL), le volume réactionnel a été complété à 20 µl avec de l'eau distillée. Les deux réactions ont été incubées à 37°C pendant 90 minutes. Les produits de digestion ont ensuite été analysés sur gel d'agarose 1 % (p/v) et purifiés à l'aide de la trousse de purification d'ADN "Wizard™ Plus DNA Purification System" (Promega, Madison, WI, USA).

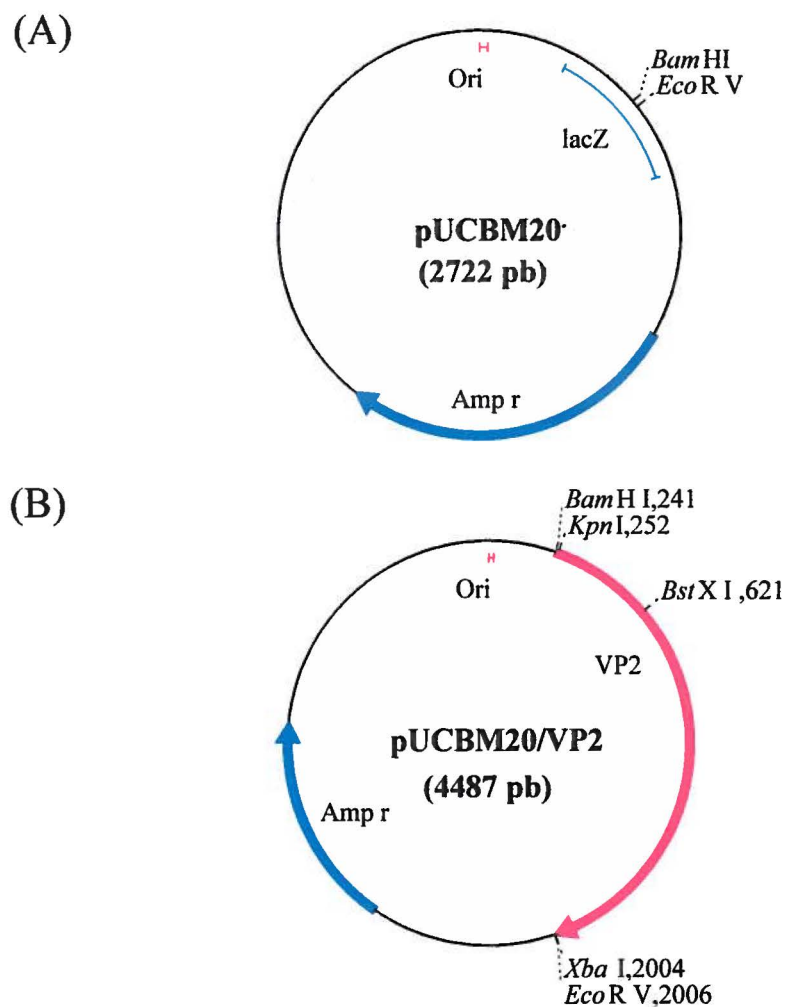
6.3 Ligation de l'insert au vecteur pUCBM20

La réaction de ligation a été réalisée avec 60 ng de vecteur pUCBM20 digérés mélangés à 90 ng d'inserts digérés (souche Kresse ou NADL-2), 1 U de ligase à ADN du bactériophage T4 (GibcoBRL), 3 µl d'eau stérile et 2 µl de tampon ligase 5X (250 mM Tris-HCl, pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 5mM ATP, 5mM DTT, 25% [p/v] de polyéthylène glycol-8000) (GibcoBRL). La ligation a été effectuée dans un bain-marie à 25°C pendant 1 heure.

Figure 9: Clonage du gène codant pour la protéine VP2 dans le vecteur de transfert pUCBM20

(A) Vecteur pUCBM20 qui possède les sites de restriction uniques *Bam*H I et *Eco*R V. Ces sites sont situés dans le cadre de lecture de *lacZ*, permettant une sélection bleu/blanc des clones recombinants.

(B) Insertion du gène codant pour la VP2 dans le vecteur pUCBM20. La position des sites de restriction importants est notée.



6.4 Préparation de cellules compétentes *E. coli* XL-1 blue

La méthode de préparation des cellules compétentes est une adaptation de la méthode de Inoue *et al.* (1990). Une colonie isolée de bactéries XL-1 sur gélose a été ensemencée dans 20 ml de milieu LB (Bacto tryptone à 1 % [p/v], extraits de levure à 0,5 % [p/v] et 170 mM NaCl) et a été incubée avec agitation toute la nuit à 37°C. Par la suite, 2,5 ml de la culture ont été prélevés pour ensemencer 250 ml de milieu SOB (Bacto tryptone à 2 % [p/v], extraits de levure à 0,5 % [p/v], 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄). La culture bactérienne a été agitée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,94 à 600 nm. La culture a alors été transférée dans une bouteille à centrifugation en polypropylène de 250 ml (Nalgene®) et placée sur la glace pendant 10 minutes. Les bactéries ont été centrifugées 10 minutes à 4°C à une vitesse de 2 500g (centrifugeuse Sorvall®, modèle RC5C). Le culot a été resuspendu dans 80 ml de TB (10 mM PIPES, 55 mM MnCl₂, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl, pH 6,7) et a été incubé pendant 10 minutes sur glace et centrifugé de nouveau 10 minutes à 2 500g à 4°C. Le culot résultant a ensuite été resuspendu dans 20 ml de TB à 4°C où du diméthyl sulfoxyde (DMSO) a été ajouté à une concentration finale de 7 % (v/v). Les cellules ont alors été laissées 10 minutes sur glace, aliquotées et congelées rapidement dans un bain de glace sèche/éthanol, puis conservées à -80°C.

6.5 Transformation des bactéries XL-1 compétentes

La méthode utilisée pour transformer les bactéries compétentes fut celle du choc thermique. Premièrement, 5 µl des produits de ligation ont été ajoutés à un tube de 15 ml en propylène Falcon® (Becton Dickinson Labware, Lincoln park, NJ, USA) et déposés sur glace pendant 20 minutes. Ensuite, 50 µl de bactéries XL-1 blue compétentes ont été ajoutées au tube et le tout a été incubé sur glace pour un autre 20 minutes. Les tubes ont ensuite été transférés rapidement dans un bain à 42°C pendant 45 secondes, sans agitation, puis remis immédiatement sur glace pour une courte incubation de 5 minutes.

Par la suite, 0,5 ml de milieu LB a été ajouté au tube et le mélange a été incubé pendant 45 minutes à 37°C avec agitation. Finalement, 100 µl de bactéries transformées ont été étalées sur gélose LB-agar (1,5% [p/v] agar [Difco, Détroit, MI, USA]) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, 0,8 µg/ml d'isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) et 500 µg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (X-gal). Les géloses ont été incubées à 37°C toute la nuit.

6.5.1 Culture des colonies

Les colonies blanches obtenues pour chaque clone (NADL-2/Kresse) ont, dans un premier temps, été mises en culture dans 3 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline et étalées, en deuxième lieu, sur une gélose maîtresse LB-agar contenant X-gal/IPTG/ampicilline. Les suspensions bactériennes ont été incubées à 37°C toute la nuit sous agitation (250 rpm) et la gélose maîtresse, sans agitation.

6.6 Extraction rapide de l'ADN plasmidique des colonies recombinantes

L'ADN plasmidique des recombinants pUCBM20 a été extrait grâce à une version légèrement modifiée de la méthode d'extraction d'ADN de LeGouill *et al* (1994). À partir d'un bouillon de culture d'un clone, 50 µl ont été transférés dans un microtube et centrifugés 1 minute à 13 200 rpm (microcentrifugeuse MicroMax®, modèle OM3590, IEC, Needham Heights, MA, USA) pour recueillir le culot de bactéries. Après avoir jeté le surnageant, le culot a été suspendu dans 16 µl de tampon de lyse (40 volumes de solution 2 [0,2 N NaOH, 1 % [p/v] de dodécyl sulfate de sodium (SDS)], 11 volumes d'eau stérile, 9 volumes de tampon de chargement). Ensuite, 3 µl de solution 3 (3 M acétate de potassium, 11,5% [v/v] d'acide acétique glacial) ont été ajoutés. Le tout a été centrifugé 4 minutes à 13 200 rpm. Du surnageant, 10 µl ont été chargés sur un gel d'agarose 0,8 % (p/v) et migrés à 120 volts pendant une heure. Après coloration du gel dans un bain de bromure d'éthide, les clones contenant l'insert ont été repérés par visionnement du gel sous rayons ultra-violets, les clones

possédant l'insert ayant une mobilité électrophorétique plus restreinte. Par la suite, 3 ml de milieu LB-ampicilline 100 µg/ml ont été inoculés pour chacun des clones positifs et incubés à 37°C, avec agitation (250 rpm), pour la nuit.

6.7 Purification des plasmides recombinants

La purification de l'ADN plasmidique s'est faite selon la méthodologie fournie avec la trousse commerciale de préparation d'ADN "Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification system" (Promega, Madison, WI, USA). Cette trousse permettait d'obtenir rapidement une bonne quantité d'ADN pur. L'ADN ainsi obtenu a été quantifié sur gel d'agarose 1 % (p/v) et par spectrophotométrie avec l'appareil BeckmanDU®-8 "UV-Visible Spectrophotometer" de Beckman (Irvine, CA, USA).

6.7.1 Digestion enzymatique et analyse sur gel

L'ADN des clones obtenu à la section 6.7 a été digéré afin de s'assurer que le vecteur contenait véritablement le gène de la protéine VP2 du PPV. La procédure utilisée fut celle décrite à la section 6.2 en utilisant les endonucléases *Bam*H I (10 U) et *Eco*R V (10 U); 3 µl d'ADN préparés à la section 6.7 ont été digérés. Seuls les clones générant un fragment de 1,7 kpb, correspondant au gène VP2, et un fragment de 2,7 kpb, vecteur pUCBM20 linéarisé, ont été retenus.

6.7.2 Maxipréparation des clones positifs

Une colonie isolée pour chaque clone positif a servi pour l'inoculation de 500 ml de milieu LB-ampicilline 100 µg/ml. Les cultures ont été incubées à 37°C avec agitation pour la nuit. L'ADN plasmidique des clones a été purifié à l'aide de la trousse commerciale de préparation d'ADN "Wizard™ Plus Maxipreps DNA Purification system" (Promega). L'ADN a été quantifié tel qu'expliqué à la section 6.7.

6.8 Séquençage du gène codant pour la protéine VP2

Le gène codant pour la protéine VP2 a été séquencé pour s'assurer, entre autre, que les codons d'initiation (ATG) et d'arrêt (TAG) étaient présents et que la séquence ne contenait aucune modification (mutation) qui aurait pu causer d'éventuels problèmes au niveau de l'expression. Les amorces M13 Universal Primer et M13 Reverse Primer ont été utilisées pour séquencer les extrémités 5' et 3' du gène.

Le gène codant pour la VP2 débute au nucléotide 2287 (codon d'initiation ATG) et se termine à la position 4547 (codon d'arrêt TAG) du génome complet du PPV. Afin d'assurer le séquençage du gène de la VP2, les amorces PPV-25, PPV-30, PPV-31, PPV-50 ont été utilisées (tableau 5). Les réactions de séquençage ont été réalisées selon la méthode de didéoxy de Sanger et effectuées à l'aide d'un séquenceur automatisé A.L.F.TM (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suède) du Service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. L'analyse des séquences obtenues en comparaison avec la séquence originale de la VP2 a été réalisée grâce au programme DNASIS (v.6.00) (Hitachi Software Engineering America, Ltd., San Francisco, CA, USA).

7. CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pPICZB

Le vecteur pPICZB (Invitrogen®, San Diego, CA, USA) est un vecteur utilisé dans le système d'expression de la levure *Pichia pastoris*. Ce système d'expression a été choisi pour la production de capsides recombinantes du PPV pour son taux d'expression potentiellement élevé et pour les faibles coûts d'utilisation de ce système. La trousse commerciale d'expression *Pichia pastoris* d'Invitrogen® a été utilisée.

Tableau 5: Amorces utilisées pour le séquençage du gène codant pour la protéine VP2 du PPV inséré dans le vecteur pUCBM20

AMORCE	SENS/POSITION*	ANTISENS/POSITION
PPV-PR25	3905-3920	
PPV-PR30		4446-4426
PPV-PR31	3558-3575	
PPV-PR50	3172-3188	

(*) Position sur le brin positif du parvovirus porcin (PPV).

7.1 Production du vecteur d'expression pPICZB

Ce vecteur d'expression a spécialement été conçu par la compagnie Invitrogen® afin de produire une forte expression de protéines hétérologues dans la levure *Pichia pastoris* (figure 10). Dans un premier temps, 10 ng de vecteur pPICZB ont été utilisés pour transformer des bactéries XL-1 compétentes selon la méthode expliquée à la section 6.5. Les colonies obtenues ont ensuite été mises en culture et l'ADN plasmidique a ensuite été purifié et analysé sur gel selon la méthode décrite à la section 6.7.

7.2 Ligation et transformation

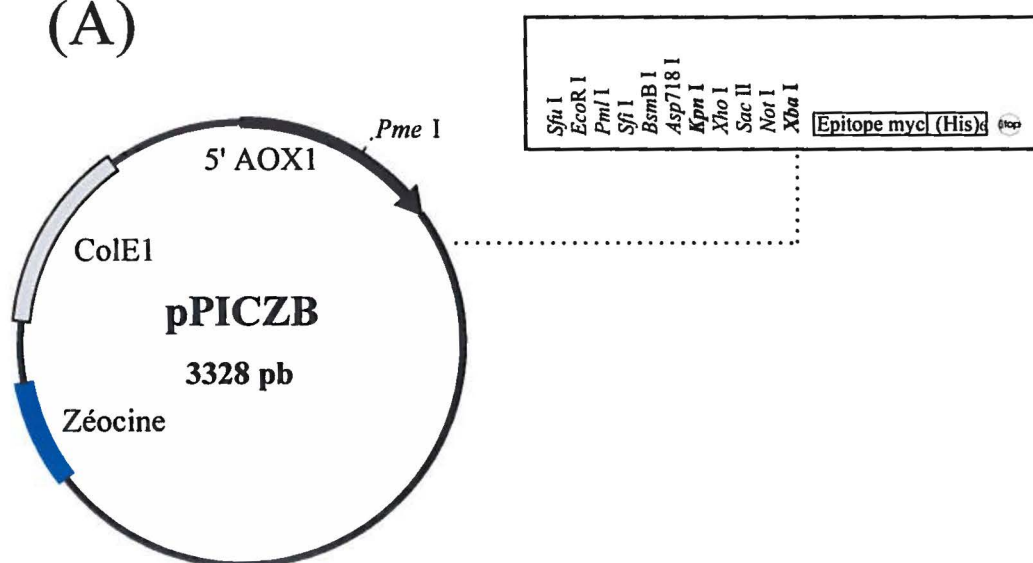
Avant d'entreprendre l'expression de la protéine VP2 chez la levure *Pichia pastoris*, le gène codant pour cette dernière a préalablement été cloné dans le vecteur d'expression pPICZB. Dans un premier temps, il a fallu rendre compatibles les extrémités du vecteur et de l'insert. Les sites *Kpn* I et *Xba* I avaient été incorporés dans les amorces du PCR, ces mêmes sites se retrouvaient dans le vecteur pPICZB, ce qui permettait un clonage directionnel de l'insert au vecteur. Alors, 3 µg de vecteur pPICZB obtenus à la section 7.1 ont été digérés par 20 U d'enzyme *Kpn* I (GibcoBRL) et 20 U d'enzyme *Xba* I (GibcoBRL) dans 5 µl de tampon One-Phor-All 10X (100mM Tris acétate pH 7,5, 100 mM acétate de magnésium et 500 mM acétate de potassium) (Pharmacia) et 21 µl d'eau stérile. Parallèlement, 2 µg de vecteur pUCBM20, contenant l'insert, ont été digérés avec 10 U de *Kpn* I, 10 U de *Xba* I et 15 U de *Dra* I (Pharmacia). Cette dernière coupe le vecteur pUCBM20 à trois endroits différents assurant ainsi que le vecteur ne se religuerait pas à l'insert lors des réactions de ligation. Au mélange enzymatique sont venus s'ajouter: 2 µl de tampon One-Phor-All 10X et 13 µl eau stérile. Les réactions ont été incubées 2 heures à 37°C. Le patron des digestions a été analysé sur gel d'agarose 1% (p/v) et le vecteur pPICZB, ainsi que l'insert, ont été purifiés à l'aide de la trousse commerciale "Wizard™ DNA clean up system" (Promega), tel que décrit à la section 6.2.

Figure 10: Vecteur d'expression pPICZB

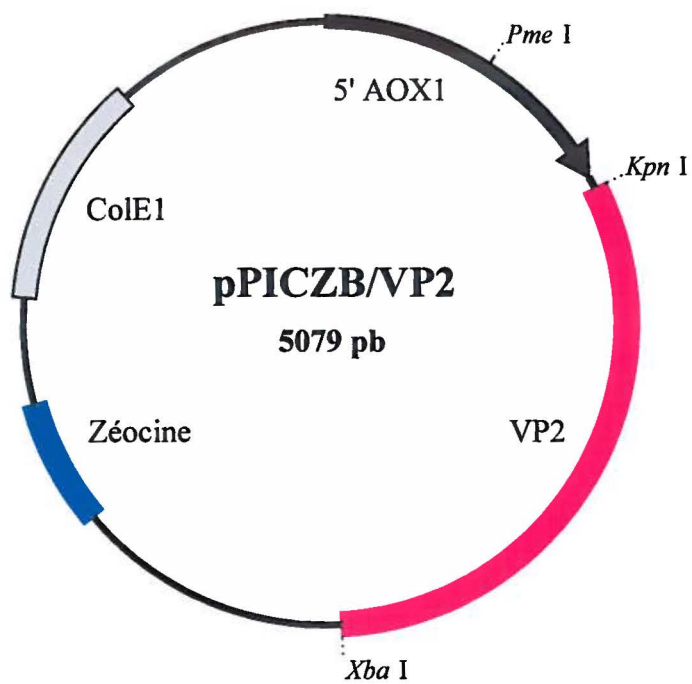
(A) Le vecteur pPICZB est un vecteur désigné pour l'expression de protéines recombinantes dans la levure *Pichia pastoris*. Ce plasmide possède un fragment du promoteur fort *AOX1* permettant une expression à haut niveau (régulée par le méthanol) qui cible l'intégration du vecteur au locus *AOX1* de la levure. Le gène *Sh ble* permet une sélection pour la résistance à l'antibiotique zéocine™ dans la bactérie *E. coli* et dans la levure *Pichia pastoris*. Le site de restriction *Pme* I est unique et permet la linéarisation du vecteur au locus *AOX1*, permettant une intégration efficace au génome de la levure. Les sites de restriction utilisés pour insérer le gène de la VP2 sont représentés en caractères gras.

(B) Gène codant pour la protéine VP2 (NADL-2 ou Kresse) inséré aux sites *Kpn* I et *Xba* I du vecteur de transfert pPICZB de la levure *Pichia pastoris*.

(A)



(B)



7.3 Ligation dans le vecteur d'expression

Pour la ligation, 100 ng du vecteur pPICZB et 360 ng d'insert ont été ajoutés à 4 µl de tampon ligase 5X (GibcoBRL), 1 U de ligase à ADN du bactériophage T4 (GibcoBRL) et 10 µl d'eau stérile. Les tubes ont été incubés à 25°C pendant 1 heure.

7.4 Transformation des bactéries

La transformation des bactéries XL-1 blue a été réalisée tel qu'expliqué à la section 6.5. Les bactéries (100 µl) ont été étalées sur gélose "Low-salt LB-Agar" (1,0 % [p/v] de tryptone, 0,5 % [p/v] de NaCl, 0,5 % [p/v] d'extraits de levure, 1,5 % [p/v] d'agar) contenant 25 µg/ml de zéocine. Les géloses ont été incubées à 37°C toute la nuit en position inversée.

7.5 Analyse des recombinants

Les clones positifs ont été identifiés dans un premier temps par la méthode rapide d'extraction d'ADN plasmidique (section 6.6). Par la suite, l'ADN plasmidique recombinant de ces clones a été purifié à l'aide de la trousse "Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification system" et quantifié sur gel agarose 1 % (p/v) et par spectrophotométrie à l'aide d'un calculateur d'ADN "Genequant RNA/DNA Calculator" (Pharmacia Biotech).

7.5.1 Digestion des clones

Les clones positifs ont été digérés afin de s'assurer que le gène codant pour la protéine VP2 y soit bien inséré. Brièvement, 10 µl d'ADN (section 7.5) ont été digérés par 5 U de *Kpn* I et 10 U de *Xba* I dans 2 µl de tampon One-Phor-All 10X (Pharmacia) et 6,5 µl d'eau stérile. Les réactions ont été incubées 2 heures à 37°C et le patron de digestion a été analysé sur gel agarose 1 % (p/v).

7.5.2 Séquençage des recombinants pPICZB

Une préparation d'ADN des clones positifs (section 7.4) a été réalisée à l'aide de la trousse commerciale QIAGEN "Plasmid Midi Kit (50)". Les extrémités 5' et 3' de ces clones ont ensuite été séquencées par le Service de séquençage de l'Institut Armand-Frappier. Les amorces 5'-AOX1 (5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3') et 3'-AOX1 (5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3') ont été utilisées pour le séquençage.

8. TRANSFORMATION DES LEVURES *PICCHIA PASTORIS*

8.1 Préparation des levures compétentes

Les souches GS115 (*his4*) et KM71 (*arg4 his4 aox1::ARG4*) ont été rendues compétentes. Ces souches possèdent une mutation au niveau du gène codant pour l'histidinol déhydrogénase (*his4*), empêchant la synthèse de l'histidine. Les deux souches se multiplient qu'en milieu supplémenté d'histidine.

La préparation des levures compétentes a été réalisée à l'aide de la trousse *Pichia* EasyComp™ Kit (Invitrogen®). Une colonie isolée de la souche KM71 ou GS115 à partir d'une gélose YPD-agar (1 % [p/v] d'extraits de levure, 2 % [p/v] de peptone, 2 % [p/v] de dextrose et 2 % [p/v] d'agar) a été inoculée dans 10 ml de milieu YPD (1 % [p/v] d'extraits de levure, 2 % [p/v] de peptone, 2 % [p/v] de dextrose). La suspension cellulaire a été incubée dans un agitateur-incubateur (250 rpm) à 30°C pour la nuit. Le lendemain, les cellules ont été diluées à une densité optique de 0,2 à 600 nm (DO₆₀₀) dans 10 ml de milieu YPD et mises dans l'agitateur-incubateur jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,6. Les cellules ont ensuite été centrifugées 5 minutes à 1 000 rpm, à la température de la pièce. Après avoir jeté le surnageant, le culot de cellules a été resuspendu dans 10 ml de la Solution I (solution de sorbitol contenant de l'éthylène glycol et du DMSO fournie dans la trousse

d'Invitrogen®). La suspension a été centrifugée de nouveau sous les mêmes conditions. Après avoir jeté le surnageant, le culot a de nouveau été resuspendu dans 1 ml de la Solution I. Les cellules ont été aliquotées (50 µl/tube) et placées à -80°C.

8.2 Linéarisation du vecteur

Le vecteur pPICZB contenant l'insert a été linéarisé par l'enzyme *Pme* I afin de permettre son intégration dans le génome de *Pichia pastoris* par "double croisement". Donc, 9 µg de vecteur ont été digérés par 12 U de l'enzyme *Pme* I (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada) dans 5 µl de tampon NEBuffer 4 10X (20 mM Tris-acétate, 10 mM acétate de magnésium, 50 mM acétate de potassium, 1 mM DTT [pH 7,9 à 25°C]), 100 µg/ml de BSA et le volume a été complété à 30 µl avec de l'eau stérile. Le tout a été incubé à 37°C pendant 2 heures. Les produits de digestion ont été visualisés sur gel d'agarose à 1 % (p/v). À la digestion, 50 µl d'eau stérile ont été ajoutés ainsi que 100 µl de phénol. Le tout a été vortexé 30 secondes puis centrifugé 1 minute à 13 200 rpm. La phase aqueuse a été récupérée et 100 µl de chloroforme (CHCl₃) ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés pendant 30 secondes et centrifugés de nouveau. L'ADN de la phase aqueuse a ensuite été purifié comme suit: 10 µl d'acétate de sodium 3 M et 275 µl d'éthanol 100 % ont été ajoutés à la phase aqueuse et mélangés au vortex pendant 30 secondes. La solution a été incubée à température de la pièce pendant 5 minutes et centrifugée 15 minutes à 13 200 rpm. Le surnageant a été jeté et 1 ml d'éthanol à 70 % a été ajouté au culot d'ADN. Après une centrifugation de 10 minutes à 13 200 rpm, le surnageant a été jeté et le culot a été séché 5 minutes dans un incubateur à 37°C. Par la suite, l'ADN a été resuspendu dans 10 µl d'eau distillée stérile.

8.3 Transformation des levures

Dans un microtube, 50 µl de levures compétentes (GS115 ou KM71) et 3 µg d'ADN

linéarisé (section 8.2) ont été ajoutés; 1 ml de la Solution II (solution PEG d'Invitrogen®) a été ajouté et le tout a été mélangé au vortex. Les tubes ont été mis à 30°C pendant 1 heure, en mélangeant toutes les 15 minutes au vortex. Les cellules ont ensuite été soumises à un choc thermique de 42°C pendant 10 minutes. Les cellules ont été réparties dans 2 tubes dans lesquels a été ajouté 1 ml de milieu YPD. Elles ont ensuite été incubées pendant 1 heure à 30°C. Après, les cellules transformées ont été centrifugées 5 minutes à 3 000 g à la température de la pièce. Les culots de cellules ont été resuspendus dans 500 µl de Solution III (solution saline d'Invitrogen®) et combinés dans un seul tube. Les cellules ont été centrifugées de nouveau et le culot, resuspendu dans 150 µl de Solution III. Les cellules ont été étalées sur gélose YPDS-agar (1 % [p/v] d'extraits de levure, 2 % [p/v] de peptone, 2 % [p/v] de dextrose, 1 M de sorbitol et 2 % [p/v] d'agar) contenant 100 µg/ml de zéocine.

8.4 Extraction d'ADN génomique des levures

Dans le but de vérifier l'intégration du vecteur pPICZB/VP2 dans la levure *Pichia pastoris*, un PCR, visant à amplifier une petite partie du gène codant pour la protéine VP2, a été réalisé. Dans un premier temps, l'ADN des levures recombinantes a été extrait afin d'être utilisé comme gabarit pour la réaction de PCR.

Des nombreux clones obtenus par transformation (section 8.3), 20 colonies isolées ont été choisies pour inoculer 20 tubes de culture contenant chacun 5 ml de milieu YPD. Les cultures ont été incubées une nuit sous agitation à 30°C. Le lendemain, les cellules ont été centrifugées 5 minutes dans une centrifugeuse clinique de table (DAMON/IEC division, MA, USA) et le culot a été resuspendu dans 0,5 ml d'eau distillée stérile. La suspension de levures a été transférée dans un microtube et centrifugée 5 secondes à 13 200 rpm. Les culots ont été mélangés brièvement avec le liquide résiduel et resuspendus dans 200 µl de tampon de lyse (2 % [v/v] de Triton X-100, 1 % [v/v] de SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 et 1 mM EDTA, pH 8,0). À chaque tube, 200 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1) et 0,3 g de billes de verre 0,5 mm (Sigma) ont été ajoutés.

Les tubes ont été mélangés vigoureusement pendant 3 minutes pour la première fois et brièvement une seconde fois avec 200 µl de tampon TE (10 mM Tris, pH 8,0 et 1 mM EDTA). Après une centrifugation à 12 000 g pendant 5 minutes, la phase aqueuse a été récupérée et l'ADN a été précipité à l'aide de 1 ml d'éthanol à 100 %. Une centrifugation finale de 3 minutes à 12 000 g a permis d'obtenir le culot d'ADN qui a été séché pendant 5 minutes dans un incubateur à 37°C puis dissout dans 100 µl de tampon TE.

8.5 Analyse des recombinants par PCR

Les amorces sens PPV-PR27 (5'-GAATCAGCAACCTCACCACCAACC-3') et antisens PPV-PR36 (5'-AGTTAGTAGTTTTGGAGGCAGTCC-3') ont été utilisées pour l'amplification d'un fragment de 420 pb localisé dans le gène VP2 du PPV. Cette réaction permettait de déterminer la positivité de certains clones, lesquels pouvaient être utilisés, par la suite pour les expériences d'expression dans la levure *Pichia pastoris*.

À 5 µl d'ADN génomique de levure extrait (section 8.4), ont été ajoutés: 5 µl de tampon de réaction 10X (200 mM Tris-HCl [pH 8,0], 100 mM KCl, 1 % [v/v] de Triton X-100 et 500 µg/ml d'albumine sérique bovine [BSA]), 7,5 µl de MgCl₂ (20 mM) et 32,5 µl d'eau stérile. Les échantillons ont été déposés dans un thermocycleur Touchdown™ (Hybaid®, Teddington, UK) et ont subi un "hot start" dans les mêmes conditions qu'à la section 5.1. Ensuite ont été ajoutés: 5 µl de tampon de réaction 10X, 2,0 µl de l'amorce PPV-PR27 (50 pmol/µl), 2,0 µl de l'amorce PPV-PR36 (50 pmol/µl), 2 µl de dNTP (10 mM), 38,7 µl d'eau distillée stérile, et 1,5 U de polymérase LabQuip (LabQuip Ltd, Woodbridge, ON, Canada). Le programme d'amplification suivant a été suivi: dénaturation de 1 minute à 94°C, 1 minute et 30 secondes à 59°C pour permettre l'appariement des amorces et 2 minutes à 72°C pour permettre la synthèse de l'ADN.

Ce cycle a été répété quatre fois. Un second cycle: 1 minute à 94°C, 1 minute à 64°C et 2 minutes à 72°C, a été répété 28 fois. Finalement, une élongation de 10 minutes à 72°C a permis d'allonger les brins d'ADN incomplets nouvellement synthétisés. Les produits de PCR ont été analysés tel que décrit à la section 5.3.

9. EXPRESSION DES CAPSIDES RECOMBINANTES

9.1 Induction des levures recombinantes

Plusieurs clones ont été analysés (gène de la VP2 des souches Kresse ou NADL-2 intégré aux souches KM71 ou GS115). Les essais d'induction ont été effectués sur les colonies positives à la réaction de PCR à l'aide du protocole fourni par la compagnie Invitrogen®. En utilisant une colonie isolée, 10 ml de milieu générateur de biomasse MGYH (1,34 % [p/v] de YNB [Base azotée de levures], 1 % [v/v] de glycérol, 4×10^{-5} % [p/v] de biotine, 0,004 % [p/v] d'histidine) ont été inoculés pour chaque clone dans un Erlenmeyer de 125 ml. Les cultures ont été placées dans un incubateur-agitateur à 29°C à une vitesse de 300 rpm jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO_{600}) de 2 à 6. Les cellules ont ensuite été récoltées par centrifugation à 2 000 rpm, 5 minutes, à la température de la pièce. Le culot de cellules a été resuspendu à une DO_{600} de 1,0 avec 20 ml de milieu inducteur MMH (1,34 % [p/v] de YNB, 1 % [v/v] de glycérol, 4×10^{-5} % [p/v] de biotine, 0,5 % [v/v] de méthanol) dans un Erlenmeyer de 125 ml recouvert de 2 couches de coton-fromage stérile. Les cultures ont été placées dans un incubateur-agitateur dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-haut. Afin de maintenir les conditions idéales d'induction, 0,5 % de méthanol a été ajouté toutes les 24 heures pour combler les pertes dues à l'évaporation. Des échantillons de 1 ml ont été récoltés à ces temps précis: 0, 6, 12 et 24 heures (jour 1), 36 et 48 heures (jour 2), 60 et 72 heures (jour 3), 84 et 96 heures (jour 4). Les échantillons ont servi à l'évaluation des niveaux d'expression en fonction du temps d'induction.

9.1.1 Préparation des échantillons

Les échantillons qui ont servi à la cinétique d'expression ont été préparés comme suit: 1 ml de culture de levures a été centrifugé pendant 2 minutes à 13 200 rpm afin de récolter les cellules. Par la suite, différentes stratégies pour la lyse des levures ont été utilisées afin de vérifier l'expression intracellulaire de capsides recombinantes.

La première méthode utilisée fut celle proposée dans le protocole d'Invitrogen® où le culot de cellules est resuspendu dans 100 µl de tampon BB (50 mM phosphate de sodium, pH 7,4, 1mM fluorure de phénylméthylsulfonyl [PMSF], 1 mM EDTA, 5 % [v/v] de glycérol). À la suspension, 100 µl de billes de verre de 0,5 mm ont été ajoutées. Les tubes ont été mélangés 30 secondes puis incubés 30 secondes et ce, 8 fois. Les mélanges ont ensuite été centrifugés à 13 200 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un autre microtube. Du lysat cellulaire (surnageant), 50 µl ont été mélangés à 50 µl de tampon d'électrophorèse (0,25 M Tris-HCl, pH 6,8, 5 % [p/v] de SDS, 0,025 % [p/v] de bleu de bromophénol, 10 % [v/v] de glycérol, 2,5 % [v/v] de β-mercaptoéthanol).

Une deuxième méthode provient d'un protocole tiré de "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1994). Cette technique est basée sur la lyse des levures en condition acide. Brièvement, le culot des échantillons récoltés par centrifugation (section 9.1) a été resuspendu dans 0,5 ml de tampon TE (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) et 50 µl de SDS à 10 % (p/v) ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés délicatement par inversion et placés dans un bain-marie à 65°C pendant 20 minutes. Au lysat cellulaire, 200 µl d'acétate de potassium 5 M ont été ajoutés. Les tubes ont de nouveau été mélangés et mis sur glace pendant 30 minutes, puis centrifugés 3 minutes à 13 200 rpm à température de la pièce. Le culot a été resuspendu dans 20 µl de tampon d'électrophorèse décrit plus haut, prêt à être analysé sur gel SDS-PAGE.

Finalement, une dernière méthode faisant appel aux ultrasons a été testée. Le culot des cellules (levures) a été resuspendu dans 2 ml de NaHCO_3 0,1 M (pH 8,6). Les cellules ont été soumises à 5 expositions répétées de 20 secondes aux ultrasons (Braun-Sonic 2000) à 60 MHz. Par la suite, 200 μl de ce lysat ont été ajoutés à 200 μl de trypsine 100 X et incubés à 37°C pendant 30 minutes. Après trypsinisation, tout le mélange a été concentré à l'aide d'un microconcentrateur Microcon® 30 (Amicon Inc., Beverly, MA, USA), l'éluat final étant de 10 μl de protéines concentrées. Les protéines ont été diluées dans 50 μl d'eau stérile et 20 μl de la dilution ont été ajoutés à 4 μl de tampon d'électrophorèse 6X (décrit précédemment) pour l'analyse sur gel SDS-PAGE.

9.2 Détection des capsides recombinantes

L'analyse de l'expression des capsides recombinantes a été réalisée grâce à trois méthodes: l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS-PAGE), la microscopie électronique et le test "Enzyme-linked immunosorbent assay" (ELISA).

9.2.1 Électrophorèse sur gel SDS-PAGE

La protéine VP2 (environ 64 kDa) peut être visualisée sur gel SDS-PAGE selon la méthode de Laemmli (1970). Un gel de séparation (12 %) a été préparé comme suit: 6 ml de 37.5:1 d'acrylamide/bisacrylamide ont été ajoutés à 3,75 ml de tampon de séparation (1,5 M Tris-HCl avec 0,4 % [p/v] de SDS, pH 8,8), 5,25 ml d'eau stérile, 0,05 ml de persulfate d'ammonium à 10 % (p/v) et 0,01 ml de TEMED. Après polymérisation du gel, un gel d'entassement (5 %) a été préparé de la façon suivante: 2,5 ml de 37.5:1 d'acrylamide/bisacrylamide, 3,75 ml de tampon d'entassement (0,5 M Tris-HCl avec 0,4 % [p/v] SDS, pH 6,8), 8,75 ml d'eau stérile, 0,05 ml de persulfate d'ammonium à 10 % (p/v) et 0,01 ml de TEMED ont été mélangés. Le mélange a ensuite été déposé doucement sur le

gel de séparation polymérisé. Les différents échantillons préparés (section 9.1.1) ont été bouillis pendant cinq minutes pour dénaturer les protéines puis 12 µl ont été chargés sur gel. La migration des échantillons s'est faite à un voltage constant de 200 volts pendant 45 minutes dans l'appareil "Mini-Protean II" (Biorad) contenant environ 200 ml de tampon d'électrophorèse SDS (3 % [p/v] de Tris base, 14,4 % [p/v] de glycine, 1 % [p/v] de SDS). Les gels ont ensuite été colorés dans une solution de coloration (0,1 % [p/v] de bleu de coomassie, 40 % [v/v] de méthanol, 10 % [v/v] d'acide acétique glacial) pendant 1 heure pour être trempés ensuite dans une solution de décoloration (5 % [v/v] d'acide acétique, 16,5 % [v/v] de méthanol) jusqu'à l'apparition de bandes sur le gel.

9.2.2 Microscopie électronique par imprégnation négative

Des grilles de cuivre recouvertes de Formvar et de carbone ont été déposées au fond d'un microtube (Beckman) contenant 100 µl de lysat cellulaire obtenus à la section 9.1.1. Les tubes ont ensuite été centrifugés par ultracentrifugation (Beckman® Airfuge™) à 10 Psi, 5 minutes. Les grilles ont été récoltées et lavées 3 fois à l'eau distillée. Les grilles ont ensuite été immergées sur une goutte d'acide phosphotungstique (PTA) à 3 % (v/v) à un pH de 7,0. Après 5 à 10 minutes de coloration, l'excès de PTA a été absorbé à l'aide d'un papier filtre Whatman® #1 (Fisher Scientific, Kent, Angleterre). Les grilles ont été visionnées en microscopie électronique à transmission (Hitachi, modèle 7100) et des microphotographies ont été prises.

9.2.3 Détection des capsides par test ELISA

L'expression des capsides recombinantes a également été détectée par un test ELISA selon la méthodologie tirée de "Current Protocols in Molecular Biology" (Ausubel *et al.*, 1994). Le surnageant cellulaire (100 µl) des clones recombinants a été adsorbé sur un microplateau de 96 puits de Nunclon™ (Nunc, Roskilde, Danemark) pendant toute une nuit à 4°C avec une légère agitation. Après 3 lavages avec 150 µl de TBST (50 mM Tris-HCl,

pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % [v/v] de Tween-20), 150 µl de solution de blocage (lait écrémé 2,5 % [p/v]) ont été ajoutés à chaque puits. Le blocage s'est fait à la température de la pièce sur une plaque mouvante pendant 1 heure. Par la suite, les puits ont été lavés 3 fois avec du TBST; 100 µl d'une dilution (1:500 dans TBST) de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 de souris ont été ajoutés pour chacun des puits et le tout a été incubé pendant 3 heures à la température de la pièce. Les puits ont de nouveau été lavés avec du TBST, puis 100 µl d'une dilution (1:1000 dans du TBST) d'un anticorps anti-souris couplé à la peroxydase (Boehringer Mannheim) ont été ajoutés pour chaque puits et incubés à température de la pièce pendant 3 heures, avec agitation. Les puits ont ensuite été lavés 5 fois avec du tampon TBST. Finalement, la solution révélatrice composée de: 1 mg/ml de o-phénylenediamine (OPD) dans un tampon citrate (0,08 M acide citrique, pH 5,2) avec 1 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 % (v/v) a été ajoutée. La réaction colorimétrique a été analysée à l'aide d'un lecteur de microplateaux EAR 400 AT (SLT-Lab instruments, Autriche) à une longueur d'onde de 450 nm.

10. ANALYSE TRADUCTIONNELLE DE LA VP2

Dans le but de vérifier la population de transcrits de VP2, les ARN totaux de clones recombinants levuriformes ont été extraits. Les transcrits VP2 furent analysés dans une réaction de RT-PCR, ou réaction de polymérase en chaîne d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par une réaction à la transcriptase inverse.

10.1 Extraction de l'ARN total de *Pichia pastoris*

La méthodologie utilisée pour l'extraction de l'ARN est basée sur un protocole de la compagnie Invitrogen®. Pour ce qui est de la culture et de l'induction des clones, la méthodologie présentée à la section 9.1 a été respectée. Le culot de cellules a été resuspendu dans 400 µl de tampon AE (50 mM acétate de sodium, pH 5,3, 1 mM EDTA). Toutes les solutions utilisées pour la manipulation d'ARN ont été préparées avec de l'eau traitée au

diéthyl pyrocarbonate (DEPC). Il est également à noter que toute manipulation de l'ARN en solution s'est faite à l'aide d'embouts spéciaux exempts de RNase et résistants aux aérosols.

Afin de lyser les cellules, 40 µl d'une solution SDS à 10 % (p/v) ont été ajoutés à chaque tube et le tout a été vortexé environ 20 secondes. Par la suite, 500 µl de phénol ont été ajoutés, suivi d'un vortex de 20 secondes. Les tubes ont été incubés dans un bain à 65°C, pendant 4 minutes. À la fin de l'incubation, les tubes ont été déposés dans un bain de glace sèche/éthanol jusqu'à l'apparition de cristaux. Les tubes ont ensuite été centrifugés à vitesse maximale pendant 2 minutes à 4 °C. La phase aqueuse a été transférée dans un nouveau tube auquel un volume égal de phénol/chloroforme a été ajouté, le tout a été vortexé pendant 20 secondes. Les tubes ont de nouveau été centrifugés dans les mêmes conditions. La phase supérieure a été récupérée et 40 µl d'acétate de sodium 3 M, pH 5,3, et 2,5 volumes d'éthanol (-20°C), ont été ajoutés. Les tubes ont été centrifugés à vitesse maximale pendant 15 minutes à 4°C. L'éthanol a été enlevé et le culot d'ARN a été rincé à l'éthanol 80 % (v/v) puis séché brièvement. L'ARN total a finalement été resuspendu dans 20 µl d'eau distillée traitée au DEPC. La quantité d'ARN total a été mesurée par spectrophotométrie sur appareil BeckmanDU®-8. Les tubes ont par la suite été rangés à -80°C jusqu'à une prochaine utilisation.

10.2 Réaction de transcriptase inverse

Il est à noter que tous les contrôles qui s'imposaient dans les réactions de transcriptase inverse et de PCR ont été effectués en parallèle pour chaque réaction. Afin de permettre la détection du transcrit de la VP2 par PCR, l'ARN total extrait de levure devait être transformé en ADN_c à l'aide de l'enzyme transcriptase inverse.

Afin d'éviter d'éventuelles réactions "fausses-positives" en PCR, l'ADN génomique présent avec l'ARN extrait fut traité par l'enzyme DNase I. Pour chaque réaction, 4 µg

d'ARN total ont été ajoutés à 11 µl d'eau distillée, 1 µl d'un inhibiteur de RNase (RNase Block II [1 U/µl], Stratagene), 4 µl de tampon first strand buffer 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (GibcoBRL), 1 µl de DNase I exempt de RNase (10U/µl) (Boehringer Mannheim). Les réactions ont été incubées pendant 30 minutes à 37°C, puis la DNase I fut inactivée pendant 10 minutes à 80°C. Les échantillons ont ensuite été déposés sur la glace. Dans un deuxième temps, 1 µl de transcriptase inverse Expand™ à 50 U/µl (Boehringer Mannheim) a été ajouté à chaque tube ainsi que 1 µl de l'amorce non-sens PPV-PR36. Les réactions furent soumises à une incubation de 30 minutes à 42°C suivie d'une incubation à 95°C pendant 5 minutes afin d'inactiver la transcriptase inverse.

10.3 Réaction d'amplification de l'ADN_c

Un PCR conventionnel pouvait permettre de détecter indirectement si le transcrit de la VP2 était produit en utilisant des amorces internes au gène codant pour la VP2: PPV-PR27 et PPV-PR36. Les paramètres de la réaction étaient les mêmes que ceux discutés à la section 8.5. Les produits d'amplification furent analysés sur un gel d'agarose 2 % (p/v) et visionnés après traitement au bromure d'éthidium selon la méthode standard.

11. ASSEMBLAGE D'UN FRAGMENT SYNTHÉTIQUE DU GÈNE DE LA VP2

11.1 Synthèse des oligonucléotides

Une terminaison prématurée des transcrits due à des régions "AT riches" a été observée pour des protéines hétérologues produites dans *Pichia pastoris* et d'autres systèmes d'expression eucaryotes (Henikoff et Cohen, 1984; Zaret et Sherman, 1984; Irniger *et al.*, 1991; Scorer *et al.*, 1993). De plus, certains codons tels GGG (glycine) et ATA (isoleucine) sont peu ou pas reconnus par le système de traduction de cette levure (tableau 6).

L'ADN codant pour la VP2 est riche en régions A-T et quelques codons "problématiques" se situent en amont de séquence. En remodelant un gène afin qu'il présente un contenu en A-T qui se situe de 30 % à 55 %, les problèmes d'expression de nombreux gènes riches en A-T ont été surmontés (Clare *et al.*, 1991; Romanos *et al.*, 1992; Sreekrishna *et al.*, 1993). Afin de remédier à d'éventuels problèmes d'expression et pour optimiser la séquence nucléotidique de la VP2 en fonction de l'utilisation des codons et le pourcentage en bases A et T chez la levure *Pichia pastoris*, des oligonucléotides ont été synthétisés afin de reproduire les 400 premiers nucléotides du gène.

11.2 Appariement des oligonucléotides

Afin de reconstituer les 400 premiers nucléotides du gène VP2, une série de 21 oligodésoxyribonucléotides (oligos) ont été assemblés selon la méthodologie légèrement modifiée de Stemmer *et al.* (1995). Cette méthode fait appel au PCR afin de synthétiser de longues séquences à partir d'un grand nombre d'oligos. La technique d'assemblage par PCR se traduit en quatre étapes: la synthèse des oligos, l'assemblage du gène, son amplification et le clonage.

11.2.1 Assemblage

L'assemblage du gène a été réalisé grâce à un total de 21 oligos, de taille moyenne de 40 nucléotides, possédant tous des extrémités complémentaires (20 nts) les uns aux autres et qui, collectivement, représentent une version synthétique des 400 premières bases du gène VP2 (tableau 7).

Au total, 100 pmoles des 21 oligos ont été diluées dans 5 µl d'un tampon de PCR 10 X (10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM KCl, 0,1 % [v/v] de Triton X-100 et 50 mg/ml de BSA sans nucléase), 8 µl de KCl (250 mM), 5,5 µl de MgCl₂ (20 mM), 0,1 µl de dNTP (100 mM),

le tout complété à un volume de 50 µl avec de l'eau distillée. Au mélange réactionnel, 1 U de polymérase thermostable *Taq* (LabQuip) ainsi que 0,02 U de polymérase thermostable *Pfu* (STRATAGENE, LaJolla, CA, USA) ont été ajoutées. Les oligos ont été assemblés dans un thermocycleur Hybaid® selon le programme suivant: 94°C pendant 5 minutes suivi de 55 cycles à 94°C pendant 30 secondes, 52°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes. Pour terminer, un dernier cycle de 7 minutes à 72°C a été réalisé.

11.2.2 Amplification

L'amplification du mélange réactionnel s'est faite à l'aide d'une seconde réaction de PCR. Du produit de PCR obtenu à la section précédente, 5 µl d'une dilution (1:10) dans de l'eau distillée ont été ajoutés à des volumes égaux de tampon de PCR, de KCl, et de dNTP utilisés dans la réaction précédente. Seul l'ajout de l'amorce sens VP2-22 et antisens VP2-11 à 100 pmoles chacune et le nombre d'unité de polymérase *Taq* utilisée (1,6 U) et *Pfu* (0,8 U) a changé. Les mélanges réactionnels ont été déposés dans le thermocycleur et ont suivi ce programme: 95°C pendant 5 minutes, 23 cycles à 94°C pendant 30 secondes; 52°C pendant 30 secondes; 72°C pendant 60 secondes, pour se terminer par une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont été visionnés sur gel d'agarose à 2,5 % (p/v). La bande de la taille appropriée a été perforée et recueillie à l'aide d'un embout stérile puis diluée dans 30 µl de tampon TE préchauffé à 75°C. De cette solution de produits de PCR, 2,5 µl ont été amplifiés selon les paramètres établis préalablement dans cette section.

Tableau 6: Fréquence d'utilisation des codons de gènes exprimés à haut niveau dans la levure *P. pastoris* (tiré et adapté de Sreekrishna et Kropp, 1996)

a.a.	CODON	NOMBRE	FRACTION	a.a.	CODON	NOMBRE	FRACTION
Gly	<i>GGG</i>	0	0	Trp	TGG	39	1
Gly	GGA	59	0,22	Stop	TGA	0	0
Gly	GGT	197	0,74	Cys	TGT	35	0,83
Gly	<i>GGC</i>	9	0,03	Cys	TGC	7	0,17
Glu	GAG	112	0,58	Stop	TAG	1	0,2
Glu	GAA	80	0,42	Stop	TAA	4	0,8
Asp	GAT	56	0,32	Tyr	TAT	18	0,12
Asp	GAC	118	0,68	Tyr	TAC	128	0,88
Val	<i>GTG</i>	10	0,05	Leu	TTG	120	0,52
Val	GTA	8	0,04	Leu	TTA	21	0,09
Val	GTT	107	0,5	Phe	TTT	24	0,18
Val	GTC	87	0,41	Phe	TTC	104	0,81
Ala	<i>GCG</i>	1	0	Ser	TCG	6	0,03
Ala	GCA	25	0,1	Ser	TCA	14	0,07
Ala	GCT	147	0,6	Ser	TCT	89	0,47
Ala	GCC	71	0,29	Ser	TCC	71	0,37
Arg	<i>AGG</i>	2	0,01	Arg	CGG	2	0,01
Arg	AGA	111	0,79	Arg	CGA	0	0
Ser	AGT	8	0,04	Arg	CGT	26	0,18
Ser	AGC	3	0,02	Arg	CGC	0	0
Lys	AAG	145	0,79	Gln	CAG	31	0,34
Lys	AAA	38	0,21	Gln	CAA	59	0,66
Asn	AAT	18	0,13	His	CAT	11	0,13
Asn	AAC	119	0,87	His	CAC	77	0,88
Met	ATG	60	1	Leu	CTG	35	0,15
Ile	<i>ATA</i>	0	0	Leu	<i>CTA</i>	7	0,03
Ile	ATT	93	0,56	Leu	CTT	43	0,18
Ile	ATC	72	0,44	Leu	<i>CTC</i>	7	0,03
Thr	ACG	5	0,03	Pro	CCG	0	0
Thr	<i>ACA</i>	8	0,05	Pro	CCA	97	0,57
Thr	ACT	86	0,5	Pro	CCT	66	0,39
Thr	ACC	74	0,43	Pro	CCC	7	0,04

Les codons faiblement reconnus (en *italique*) sont retrouvés dans les 130 premières codons de la séquence nucléotidique de la VP2.

Tableau 7: Oligodésoxyribonucléotides utilisés pour l'assemblage d'un fragment synthétique de 400 pb codant pour une partie du gène VP2 dans le but d'optimiser l'expression dans la levure *Pichia pastoris*

Les amorces VP2-1 et VP2-22 ont également été utilisées pour la réaction d'amplification du fragment synthétique.

NOM	SÉQUENCE	Nts
VP2-1	5 ' GACGGGATCC ¹ GGTACC ² ACAATGAGTGAAAACGTTGAACAA 3 '	40
VP2-2	5 ' CACAACCCTATTAACGCTGGTACTGAATTGTCTGCTACCG 3 '	40
VP2-3	5 ' GTAACGAATCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTAG 3 '	40
VP2-4	5 ' AGGTGCTGGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGGTGGTGGTGGTAG 3 '	40
VP2-5	5 ' AACCAAACCGAATTCCAATACTTGGGTGAGGGATTGGTTA 3 '	40
VP2-6	5 ' GAATCACTGCTCACGCTTCCAGACTGATCCACCTGAACAT 3 '	40
VP2-7	5 ' GCCAGAGCACGAGACCTACAAGAGAATCCACGTCCTGAAC 3 '	40
VP2-8	5 ' TCCGAATCCGGTGTGGTGGTCAAATGGTCCAAGACGACG 3 '	40
VP2-9	5 ' CTCACACCCAAATGGTCACCCCTTGGTCCCTGATTGACGC 3 '	40
VP2-10	5 ' TAACGCTTGGGGTGTCTGGTTCAACCCAGCGGACTGG ³ CAGTTG 3 '	43
VP2-11	5 ' CAACTGCCAGTCCGCTGG ³ GTTGA 3 '	23
VP2-12	5 ' ACCAGACACCCCAAGCGTTAGCGTCAATCAGGGACCAAGG 3 '	40
VP2-13	5 ' GGTGACCATTTGGGTGTGAGCGTCGTCTTGGACCATTTGA 3 '	40
VP2-14	5 ' CCAGCAACACCGGATTCGGAGTTCAGGACGTGGATTCTCT 3 '	40
VP2-15	5 ' TGTAGGTCTCGTGCTCTGGCATGTTCAAGGTGGATCAGTCT 3 '	40
VP2-16	5 ' GGAAGCGTGAGCAGTGATTCTAACCAATCCCTCACCCAAG 3 '	40
VP2-17	5 ' TATTGGAATTCGGTTTGGTTGTTGAAAGTACCAGTAGAAA 3 '	40
VP2-18	5 ' CACCAACACCACCAGCACCTCTACCACCACCACCACCACC 3 '	40
VP2-19	5 ' ACCACCACCAGATTCGTTACCGGTAGCAGACAATTCAGTA 3 '	40
VP2-20	5 ' CCAGCGTTAATAGGGTTGTGTTGTTCAACGTTTTCACTCA 3 '	40
VP2-21	5 ' TTGTGGTACCGGATCCCGTA 3 '	20
VP2-22	5 ' GACGGGATCCGGTACCACAA 3 '	20

¹Site enzymatique *Bam*H I

²Site enzymatique *Kpn* I

³Site enzymatique *Bst*X I

11.2.3 Clonage du gène synthétique

Afin d'obtenir une bonne qualité de produits de PCR pour le clonage, un gel préparatif d'agarose à 2,0 % (p/v) a été réalisé. Sur ce gel, 15 µl de produits de PCR ont été chargés. L'ADN de la taille voulue (400 pb) a été extrait du gel à l'aide de la trousse "GENECLEAN II" (Bio 101), l'éluat d'ADN final étant de 15 µl dans de l'eau distillée. L'ADN purifié (20 ng) a été sous-cloné dans le vecteur pGEM®-T (Promega) selon la méthodologie fournie par la compagnie. Ce vecteur T possède le gène de résistance à l'ampicilline, permettant ainsi une sélection avec cet antibiotique. Des bactéries XL-1 ont été transformées (selon le protocole de la section 6.5) et les clones positifs ont été purifiés (selon la section 6.7) et séquencés par le Service de séquençage de l'Institut-Armand-Frappier à l'aide de l'amorce T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGGCGA 3').

12. CLONAGE ET EXPRESSION DU GÈNE PARTIELLEMENT SYNTHÉTIQUE

Toutes les étapes de l'assemblage du fragment synthétique jusqu'à son insertion dans le gène de la VP2 sont schématisées à la figure 11.

Les sites enzymatiques *Bam*H I et *Bst*X I sont présents dans la séquence du gène synthétique et dans la séquence du gène de la VP2 originale inséré dans le vecteur pUCBM20 permettant ainsi un échange facile de fragments après digestion enzymatique.

Brièvement, 6,5 µg de vecteur pUCBM20/VP2 et 2 µg du fragment synthétique inséré dans le vecteur pGEM®-T ont été digérés séparément à l'aide de 5 U de *Bam*H I et *Bst*X I dans 2 µl de tampon React 3 10X (GibcoBRL), le volume étant complété à 20 µl avec de l'eau distillée. Les tubes ont été incubés à 37°C pendant 2 heures et l'ADN digéré a été purifié sur gel d'agarose 1,2 % (p/v) à l'aide de la trousse "GENECLEAN II" (méthodologie de la section 6.1). À un microtube, 2 µl de fragments synthétiques digérés et purifiés ainsi que 3,5 µl de pUCBM20/VP2 dont le fragment *Bam*H I/*Bst*X I avait été excisé ont été

mélangés à 1 µl de tampon ligase (50 mM Tris-Cl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml de BSA, pH 7,8), 120 U de ligase (New England Biolabs) et le volume complété à 10 µl avec de l'eau distillée. Le mélange réactionnel a été incubé 1 heure à 25°C. Des bactéries compétentes XL-1 ont été transformées avec 5 µl du produit de ligation (méthodologie de la section 6.5) et étalées sur gélose LB-agar/ampicilline et incubées toute la nuit à 37°C.

Toutes les expériences de clonage dans le vecteur pPICZB ainsi que les tests d'expression dans les levures ont été réalisés selon la méthodologie expliquée aux sections 6.5.1 à 9.2.1 inclusivement.

12.1. Immunobuvardage de type WESTERN

Un immunobuvardage de type Western a été réalisé sur des échantillons de protéines extraits de levures recombinantes dans le but de vérifier l'expression de la protéine VP2.

Une fraction des protéines totales de levures recombinantes qui ont été concentrées (section 9.1.1) a été chargée sur un gel de polyacrylamide de 7,5 %. Le transfert protéique sur membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) a été réalisé à l'aide de l'appareil Panther™, modèle HEP-1 (Owl Scientific Inc., Woburn, MA, USA) dans un tampon de transfert (10 mM CAPS, 10 % [v/v] de méthanol, pH 11,0). Le transfert a été réalisé à un voltage de 10-14 V et un ampérage de 400 mA, pendant une heure. À la fin du transfert, la membrane a délicatement été déposée dans une solution de blocage (lait écrémé 5 % [p/v] dans du TBS), à la température de la pièce sous une douce agitation pendant 90 minutes. La membrane a par la suite été lavée 2 fois dans un bain de TBST (Tween-20 à 0,2 % [v/v]) pendant 5 minutes, suivi par trois lavages au TBS dans les mêmes conditions.

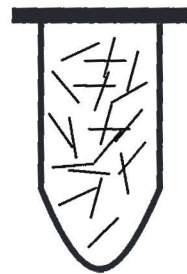
Figure 11: Étapes menant à la production de la VP2 synthétique dans la levure *Pichia pastoris*

(A) Assemblage des oligonucléotides. La première étape consiste à appairer tous les oligonucléotides dans une réaction de PCR. Le fragment synthétique produit est par la suite amplifié dans une seconde réaction de PCR à l'aide des amorces internes VP2-1 et VP2-22.

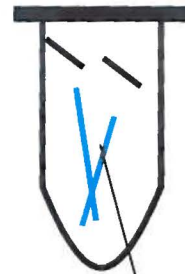
(B) Le fragment synthétique obtenu est inséré dans le gène VP2 (inséré au vecteur pUCBM20) aux sites *Bam*H I et *Bst*X I. Le fragment synthétique remplace donc les 400 premières bases originales du gène VP2. Le gène VP2 partiellement synthétique est par la suite inséré au vecteur pPICZB, aux sites *Kpn* I et *Xba* I, et les tests d'expression peuvent être amorcés dans la levure *Pichia pastoris*.

(A)

Oligonucléotides

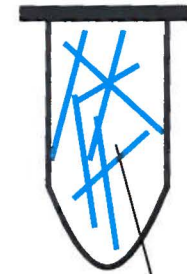


Hybridation
par PCR



fragments synthétiques

Amplification par PCR
du fragment synthétique



fragments synthétiques amplifiés

(B)

pUCBM20/VP2



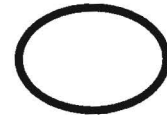
fragment synthétique

pUCBM20/VP2 synth.



clonage

pPICZB



VP2 synthétique

pPICZB/VP2 synth.



clonage

Transformation des
levures et expression



L'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 dilué 100 fois dans du lait écrémé à 2,5 % (p/v) a ensuite été ajouté. La membrane a été incubée avec l'anticorps toute une nuit à 4 °C sous agitation. Le lendemain, la membrane a été lavée comme précédemment pour ensuite être incubée avec un conjugué anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Boehringer Mannheim) dilué 500 fois dans du PBS. La membrane a été maintenue en présence du conjugué pendant deux heures à température de la pièce sous douce agitation. La membrane a été lavée puis déposée dans la solution de révélation (60 mg de 4-chloro-1-naphtol dans 20 ml de méthanol auxquels 60 µl de H₂O₂ dans 100 ml de TBS ont été ajoutés immédiatement avant usage). La révélation a été réalisée à l'obscurité pendant 15 à 60 minutes. La réaction a été arrêtée par immersion de la membrane dans de l'eau distillée en effectuant plusieurs changements d'eau. La membrane a été séchée à l'air libre entre deux papiers Whatman® #1 (Fisher Scientific).

13. PRODUCTION DE CAPSIDES RECOMBINANTES DANS BACULOVIRUS

Il est à noter que toutes les expériences de la production de capsides recombinantes des souches Kresse et NADL-2 du PPV ont été réalisées par le docteur Zoltán Zádori du laboratoire du professeur Peter Tijssen.

13.1 Production protéique

Le vecteur pUCBM20/VP2 (figure 9) a été utilisé comme gabarit pour la PCR pour l'amplification de l'ADN codant pour la protéine structurale VP2 à l'aide des amorces VP2-ACP et VPR-ACP (figure 8). L'ADN amplifié a été digéré par les endonucléases de restriction *Bam*H I et *Xba* I permettant un clonage directionnel au vecteur d'expression pFASTBAC1 du système d'expression "Bac-to-Bac" du baculovirus. Toutes les étapes ayant mené à la production de capsides recombinantes ont été suivies selon le protocole fourni par le manufacturier (Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems, GibcoBRL). Par la suite, 1 ng de vecteur recombinant pFASTBAC1/VP2 a été utilisé pour transformer des cellules bactériennes DH10Bac (*F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdKMS-mcrBC) φ80d lacZ ΔM15 ΔlacX74 deoR*

recA1 endA1 araD139 Δ(ara leu) 7697 galU galK λ⁻ rpsL nupG/bMON14272/pMON7124) contenant le bacmide et le plasmide "helper". L'identification des colonies recombinantes s'est faite par une sélection bleu/blanc. L'ADN du bacmide recombinant a été isolé, puis 5 µl de la minipréparation de l'ADN du bacmide ont été utilisés pour transfecter des cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (ATCC-CRL-1711) à l'aide de CellFectin (GibcoBRL). Les cellules transfectées ont été cultivées dans du milieu Sf-900 II Serum-Free-Medium (SFM) (GibcoBRL) dans des plateaux de culture cellulaire à 6 puits. Une cinétique d'expression a été réalisée après 48 à 72 heures post-transfection. Une optimisation de l'expression a été obtenue après transfection des cellules d'insectes High Five™ (Invitrogen®) par le bacmide recombinant. Ces cellules sont reconnues pour leur niveau d'expression plus élevé, tel que rapporté dans le catalogue du fabricant. L'analyse traductionnelle a été effectuée sur gel SDS-PAGE de 7,5 % afin de vérifier la production de protéines VP2 du PPV dans ce système.

13.2 Purification des capsides recombinantes

Les cellules High Five™ transfectées par le bacmide recombinant ont été cultivées dans des flacons de culture tissulaire Corning® de 150 mm³ (Corning) contenant du milieu High Five™ serum-free medium (Invitrogen®). Après 3 jours d'incubation à 28°C, les cellules ont été récoltées par centrifugation à 500 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire a été resuspendu dans un tampon 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,6) puis de la trypsine TRL à 0,2 % (p/v) a été ajoutée. Le traitement à la trypsine s'est fait à 37°C pour un minimum de 1 heure. Au lysat cellulaire, du chloroforme a été ajouté à raison du tiers du volume initial du lysat cellulaire. La suspension a alors été centrifugée et la phase aqueuse a été récupérée et concentrée à l'aide d'un concentrateur Centricon® Plus-80 (Millipore). Le culot de protéines concentrées a été recueilli et resuspendu dans 1 ml de tampon 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,6). À la suspension, une solution de sucrose à 20 % (p/v) a été ajoutée puis le mélange a été congelé puis décongelé afin d'obtenir un gradient. Le tout a été centrifugé à 40 000 rpm à 4°C, 2 fois, dans une ultracentrifugeuse Beckman de modèle LS-50 (Beckman).

La bande correspondant aux capsides recombinantes a été repérée sur le gradient puis retirée et resuspendue dans du tampon 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,6). Le mélange a été concentré à l'aide d'un microconcentrateur Microcon® 100 (Amicon Inc.), puis une fraction a été analysée sur gel SDS-PAGE et en microscopie électronique.

14. SÉLECTION DES PHAGOTOPES DES CAPSIDES RECOMBINANTES PPV À L'AIDE DE LIBRAIRIES PEPTIDIQUES

L'utilisation de banques peptidiques permet la sélection de séquences peptidiques ayant une affinité envers une molécule-cible. Cette approche a été utilisée afin d'identifier des déterminants de la capside du PPV pouvant jouer un rôle important lors de l'infection virale ou de la réponse immunitaire. Des capsides recombinantes, obtenues dans la section précédente, ont été les protéines cibles pour ces expériences.

14.1 Librairies peptidiques

Cinq librairies peptidiques ont été utilisées: les librairies phagiques Ph.D.-7TM (2 x 10⁹ clones) et Ph.D.-12TM (1,9 x 10⁹ clones) de New England Biolabs, les librairies phagiques 9-mer pVIII 9aa et pVIII 9aa Cys (2,6 x 10¹³ unités transductrices du gène de résistance à l'ampicilline/ml) fournies par la Dre Alessandra Luzzago (IRBM, Rome, Italie) et finalement une librairie 12-mer présentée en surface d'*E. coli* (1,77 x 10⁸ clones) (FliTrxTM de la compagnie Invitrogen). Les deux premières librairies sont des constructions de peptides présentés à la surface de la protéine pIII du bactériophage M13 (présente en 5 copies en surface). Les librairies phagiques 9-mer pVIII 9aa et pVIII 9aa Cys sont dérivées du vecteur PC89 dans lequel des oligonucléotides dégénérés ont été insérés au niveau du gène pVIII du phage M13 permettant ainsi l'exposition en surface des peptides. La librairie peptidique FliTrxTM utilise les gènes flagelline et thioredoxine pour présenter les peptides à la surface de la bactérie *E. coli*.

14.2 Titrage des phages

Des dilutions sérielles de la suspension de phages à titrer ont été réalisées dans du milieu LB. De ces dilutions, 100 µl ont été utilisés pour infecter 200 µl d'une culture de bactéries ER2537 à une DO_{600} de 0,5. Les cellules infectées ont été ajoutées à un tube stérile de 12 ml (Sarstedt) contenant de l'agarose TOP à 45°C (1 % [p/v] de Bacto-Tryptone, 0,5 % [p/v] d'extraits de levures, 0,1 % [p/v] de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ et 0,7 % [p/v] d'agarose). La solution d'agar avec les phages a ensuite été étalée soigneusement sur une gélose LB-Agar et incubée toute la nuit à 37°C en position inversée.

14.3 Sélection par affinité

Différentes techniques de sélection ont été réalisées afin d'isoler, par affinité, des séquences peptidiques.

14.3.1 Stratégies employées

Chaque librairie a été sélectionnée individuellement avec les capsides recombinantes du PPV produites dans le système d'expression du Baculovirus. La méthodologie de base pour toutes les librairies utilisées était celle fournie par la compagnie New England Biolabs pour les librairies Ph.D.-7™ et Ph.D.-12™. Dans un premier temps, un microplateau (modèle U96 Maxisorp, Nunc) ou un plateau de culture de 60 mm Falcon Rodac, modèle 1034 (Fisher Scientific Ltd., Nepean, Ontario, Canada) a été enrobé avec des capsides recombinantes en y ajoutant 100 µg/ml de capsides dans 0,1 M $NaHCO_3$ (pH 8,6), pour chaque ronde de sélection, suivi d'une incubation à 4°C pour la nuit. Ensuite, les espaces libres des puits ont été saturés avec une solution de blocage (0,1 M $NaHCO_3$ [pH 8,6], 5mg/ml de BSA, 0,02 % [p/v] de NaN_3) pendant 1 heure à 4°C. Après 6 lavages avec une solution de TBST, 2×10^{11} phages (provenant de différentes librairies) dans 100 µl de solution TBST ont été ajoutés aux puits et incubés 50 minutes sous agitation douce à la température de la pièce.

Les puits ont ensuite été lavés à 10 reprises avec du TBST pour enlever les phages non-liés. Les phages complexés aux capsides ont finalement été élués dans 100 µl d'un tampon d'élution (0,2 M glycine-HCl [pH 2,2], 1 mg/ml BSA) pour ensuite être neutralisés avec 12 µl d'une solution 1 M de Tris-HCl à un pH de 9,5. Le titre de la fraction d'élution et des phages non-liés a été déterminé selon le protocole décrit à la section 14.2. Une fraction de l'éluat total a été amplifiée: 50 µl des phages ajoutés à 20 ml de bactéries ER2537 en phase log précoce dans un Erlenmeyer de 125 ml. La culture a été incubée à 37°C avec agitation vigoureuse pendant 4,5 heures. Par la suite, la culture a été centrifugée pendant 10 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Du surnageant, 80 % ont été ajoutés à 1/6 volume de PEG/NaCl (20 % [p/v] de polyéthylène-glycol-8000, 2,5 M NaCl). Les phages ont été précipités toute la nuit à 4°C.

14.3.2 Enrichissement en phages spécifiques

Les phages élués et précipités (section précédente) ont été centrifugés pendant 15 minutes à 10 000 rpm à 4°C. Le culot de phages a ensuite été resuspendu dans 1 ml de TBS et transféré dans un microtube. Après une centrifugation à 13 200 rpm pendant 5 minutes, le surnageant de phages a été précipité de nouveau au PEG/NaCl pendant 50 minutes à 4°C. Le culot résultant a été resuspendu dans 200 µl de TBS avec 0,02 % (v/v) de NaN_3 . Cette fraction d'élution amplifiée a été titrée tel que décrit dans le protocole de la section 14.2. Une seconde et troisième ronde d'amplification ont été réalisées dans les mêmes conditions qu'à la section 14.3.1 en utilisant 2×10^{11} plaque forming units (pfu) à chaque fois.

14.4 Spécificité des clones sélectionnés

La spécificité des clones a été mesurée à l'aide du test ELISA avec les clones purifiés.

14.4.1 Production des phages

Des colonies individuelles d'*E. coli* infectées lors des titrages des phages, ayant subi trois rondes de sélection, ont étéensemencées, chacune dans un Erlenmeyer de 125 ml contenant 10 ml de milieu LB contenant 100 µl d'une culture de bactéries ER2537 de 16 heures. Les cultures ont été incubées 4,5 heures à 37°C avec agitation. Le surnageant (contenant la population de phages) a été conservé. Certains phages ont été précipités à partir du surnageant à l'aide de 1/6 volume d'une solution PEG/NaCl (20 % [p/v] de polyéthylène glycol-8000, 2,5 M NaCl) à 4 °C pour toute la nuit. Après une centrifugation de 15 minutes à 15 000 rpm (4 °C), le culot de phages a été resuspendu dans 1 ml de TBS. La solution a été précipitée de nouveau avec une solution PEG/NaCl pendant 60 minutes. Après une centrifugation de 10 minutes, le culot de phages a finalement été resuspendu dans 50 µl de TBS et placé à 4 °C. Les préparations de phages ont été titrées selon la méthodologie de la section 14.2.

14.4.2 Test ELISA

Afin de vérifier la spécificité des phages sélectionnés, un test ELISA en sandwich a été mis au point. Une concentration de 10 µg/ml à 100 µg/ml de capsides recombinantes dans 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,6) a été adsorbé à un microplateau de 96 puits (Nunc) pendant 16 heures à 4°C. Par la suite, 200 µl de la solution de blocage ont été ajoutés pendant 2 heures à la température de la pièce ou à 4 °C. Après 5-6 lavages au TBST (150 ml), 150 µl de surnageant de phages (section 14.4.1) ou des dilutions sérielles de phages précipités (section 14.4.1) allant de 10¹² virions à 2 x 10⁵ virions ont été ajoutés au plateau en utilisant comme témoins négatifs: un surnageant de phages sauvages et un surnageant de phages non-spécifiques. Après 2 heures d'incubation à la température de la pièce, les puits ont été lavés 3 fois avec 150 µl de TBST. La détection des phages fixés aux capsides a été réalisée par l'ajout de 100 µl par cupule d'un antisérum de cobaye contre le phage sauvage fd

(gracieuseté du laboratoire du docteur Michel Trudel) dilué 1/100 dans la solution de blocage. Le mélange a été incubé 90 minutes à la température de la pièce avec douce agitation. Un antisérum de lapin dirigé contre les IgG de cobaye et conjugué à la peroxydase de raifort (Miles-Yeda LTD, IL, USA) dilué 1/1000 dans TBST a été ajouté à chacun des puits. Après une incubation de 90 minutes à température de la pièce avec agitation, les puits ont été lavés 5 fois avec la solution de TBST. Une coloration à l'ABTS a été effectuée pendant 15 minutes puis la densité optique a été mesurée à une longueur d'onde de 492 nm en spectrophotométrie. Alternativement, les phages ont également été détectés à l'aide d'un anticorps monoclonal de souris anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech) suivi d'une incubation avec un anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase. Dans ce dernier cas, le substrat colorimétrique: o-phénylenediamine 1,2-benzenediamine (OPD) a été utilisé et les plaques ELISA ont été lues à une densité optique de 450 nm. Les formes répliquatives des clones positifs au test ELISA ont été purifiées à partir du culot bactérien (section 14.4.1) à l'aide de la trousse "Plasmid Mini Kit (100)" (QIAGEN) selon la méthodologie prescrite. Cette purification est basée sur une version modifiée de la lyse alcaline suivie de la liaison de l'ADN plasmidique à une résine. Un lavage du culot des bactéries infectées avec une solution STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA) a été fait au préalable afin d'enlever toute trace de surnageant de phages. L'ADN a été séquencé à l'aide de l'amorce -96 gIII (5'CCCTCATAGTTAGCGTAACG3') en aval de la séquence codante pour les différents peptides exposés en surface entre les sites enzymatiques *Kpn* I et *Eag* I.

14.5 Librairie FliTrx™

Cette librairie peptidique consiste en une présentation de chaque peptide à l'extrémité des flagelles de la bactérie GI826 (*F*⁻, *lacI*^q, *ampC*::*P*_{trp} *cI*, Δ *fliC*, Δ *motB*, *eda*::*Tn10*). Le protocole de la compagnie Invitrogen a été suivi pour ces expériences. Brièvement, 20 µg de capsides recombinantes dans 1 ml d'eau distillée stérile ont été immobilisés sur un plateau de culture cellulaire de 60 mm (Nunc® Delta) pendant une heure à la température de la pièce sous légère agitation (50 rpm). L'ajout de la librairie peptidique s'est fait selon les

conditions recommandées par le détaillant. Après 5 rondes d'amplification, des clones cibles ont été isolés sur gélose RMG-AMP (sels M9, 2 % [p/v] de casamino acids, 0,5 % [p/v] de glucose, 1 mM MgCl₂, 100 µg/ml d'ampicilline, 1,5 % [p/v] d'agar) et l'ADN des clones a été préparé à l'aide de la trousse QIAGEN (section 14.4.1).

15. MUTANTS ÉCHAPPATOIRES

Concernant la variabilité des parvovirus en général, une vaste banque de données indique qu'il existe des souches virales exhibant des caractéristiques biologiques spécifiques et qu'elles peuvent être facilement sélectionnées (revue par Siegl, 1990). Des variations au niveau des protéines de la capside peuvent affecter les propriétés antigéniques. Des changements mutationnels, résultant en l'émergence ou la disparition d'épitopes antigéniques semblent survenir assez fréquemment *in vitro* sous une pression sélective d'anticorps monoclonaux (Parrish *et al.*, 1985). Des virus pouvant échapper à la neutralisation par un anticorps monoclonal sont des outils pratiques pour étudier la cartographie d'épitopes en surface des parvovirus. Les expériences qui suivent avaient pour but d'identifier, au niveau des a.a., les déterminants du PPV importants dans la neutralisation par l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11.

15.1 Expériences préliminaires

Des cellules PT ont été ensemencées à raison de 2×10^4 ou 1×10^5 cellules par cupule d'une plaque de culture cellulaire de 24 puits. Une incubation de 3 à 4 heures à 37°C a permis l'attachement des cellules aux cupules. Par la suite, différentes concentrations de PPV (souche NADL-2) et différentes concentrations d'anticorps anti-capsides (3C9-D11-H11) ont été ajoutées aux cellules afin de déterminer la combinaison optimale pour l'obtention de mutants échappatoires. Après 24 heures post-infection, les cellules ont été fixées et visionnées en immunofluorescence (section 4).

15.2 Mesure du titre viral

Les titres des suspensions virales ou des surnageants de culture cellulaire ont été déterminés par dilutions sérielles du virus en utilisant une plaque de 96-puitsensemencée avec 2×10^4 cellules/puits, 3 à 4 heures avant l'infection. Après avoir enlevé le milieu de culture des puits, 100 μ l de dilutions 10X de la suspension virale dans du milieu DMEM (GibcoBRL) ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 24 heures, puis ont été traitées pour la procédure d'immunofluorescence (section 4) en utilisant soit l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 (dilué 30 fois dans du tampon IF) ou un mélange d'anticorps polyclonaux porcins dilué 200 fois dans le même tampon pour la détection à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-souris Ig couplé à la fluorescéine (Boehringer Mannheim)(1:1000 dans tampon IF), ou à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-porc Ig couplé à la fluorescéine (dilution 1:100 dans du tampon IF). Tous les puits contenant une ou plusieurs cellules immunofluorescentes étaient jugés positifs. Tous les tests ont été réalisés en duplicata, toujours en incluant des contrôles d'infection. Les titres ont été calculés en comptant le nombre total de plaques nucléaires fluorescentes dans chaque puits et en calculant la valeur moyenne du nombre de plaques des duplicata. Les surnageants viraux des cellules PT ont été quantifiés à partir de liquides de culture inoculés sur des cellules PT fraîches. Les titres d'infectivité ont été calculés par unité de fluorescence focale ("fluorescent focus unit"). À titre d'exemple, une unité de fluorescence focale (ffu) ou une unité TCID₅₀ correspond environ à 100 jusqu'à 10 000 particules parvovirales. Une cellule infectée produit environ 100 ffu ou TCID₅₀, c'est-à-dire environ 10^5 particules.

15.3 Quantification des molécules virales

15.3.1 Préparation du standard interne

Le standard interne (mimic A) contient une séquence du PPV, située dans la région NS entre les nucléotides 836 et 1207, clonée dans le vecteur pBluescript II KS + (Stratagene).

Normalement, l'amplification de cette région du génome viral, à l'aide des amorces PPV-80b (5'-AGTGGGTATCGCTACTAACCTACACTC-3') et PPV-119b (5'-GATCTGTCATCATCCAGTCTTCTATGC-3') donne un fragment d'ADN de 371 pb. Toutefois, une délétion de la position 863 à la position 903 dans le standard, fait en sorte qu'une amplification par la même paire d'amorces produira des amplicons plus petits de 40 nucléotides (331 pb). Après amplification par PCR, on obtient deux bandes distinctes sur gel d'agarose. Le système "mimic A" permet de quantifier rapidement et efficacement le nombre de particules virales du PPV dans un échantillon donné, par densitométrie.

15.3.2 PCR Quantitatif-compétitif (Qc-PCR)

Le surnageant de cellules infectées par la souche NADL-2 du PPV a été récolté dans des microtubes stériles afin de quantifier le nombre de molécules virales dans des cultures du PPV (sauvage ou mutants échappatoires) en présence ou en absence de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11. Pour chaque microtube, 1 µl de surnageant a été ajouté à 1 µl de dNTP (10mM); 5 µl de tampon 10X; 3,75 µl $MgCl_2$ (20 mM); 1 µl de chacune des amorces PPV- 80b et PPV-119b; 1 U de polymérase LabQuip, le tout complété à 50 µl avec de l'eau distillée dans des tubes à PCR contenant des dilutions sérielles du standard interne (mimic A). Les conditions d'amplification étaient les suivantes: 5 minutes à 95°C suivi de 35 cycles d'amplification (95°C, 30 secondes; 52°C, 30 secondes; 72°C, 50 secondes terminé par une élongation finale de 9 minutes à 72°C). Les réactions de PCR ont été déposées sur un gel d'agarose à 1,8 % (p/v). Le gel a été coloré dans un bain de bromure d'éthide. Le gel a été photographié et la photographie a été analysée par densitométrie à l'aide du programme analytique "ID Image Analysis Software" (Kodak Digital Science™). Grâce aux données obtenues à l'aide de ce logiciel, une courbe du logarithme du rapport entre l'intensité de la cible (molécules virales) et l'intensité du standard interne (mimic A) en fonction du logarithme du nombre de molécules du standard a été tracée à l'aide du programme Excel 97 (Microsoft Corporation).

Le nombre de molécules virales dans chaque échantillon a été déterminé en trouvant le point de la courbe où le rapport entre l'intensité de la cible et l'intensité du standard est égal à 1.

15.4 Sélection des mutants échappatoires et analyse

Des mutants ont été sélectionnés par passages répétés du virus NADL-2 en cellules PT en présence de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11. L'anticorps monoclonal a été laissé dans le milieu cellulaire pour permettre une pression évolutive: seuls les virus mutés au site de reconnaissance de l'anticorps peuvent échapper à la neutralisation. Les virus isolés ont été étudiés en immunofluorescence après chaque passage avec l'anticorps utilisé pour la sélection et à l'aide d'un mélange d'anticorps polyclonaux porcins jusqu'à l'obtention d'un pool viral insensible à la neutralisation par l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 (1 à 10 cellules infectées par puits de 2×10^4 cellules). Des clones viraux des virus mutants sélectionnés ont été obtenus en cultivant ces virus à diverses concentrations. Ces clones ont dû être amplifiés par PCR pour déterminer, par séquençage, dans quelle région des protéines VP se situait la mutation "échappatoire". La région soupçonnée d'être reconnue par l'anticorps se situait probablement dans la jonction VP1/VP2, région importante dans la neutralisation pour d'autres parvovirus où l'importance antigénique a été étudiée par différents groupes.

15.5 PCR sur mutants échappatoires

L'ADN viral des mutants a été amplifié à des fins de séquençage. L'ADN polymérase haute fidélité PLATINUM *Pfx* (GibcoBRL) a été utilisé pour les réactions de PCR. Cet enzyme et son tampon ("PCRx Enhancer Solution") facilitent l'amplification de séquences riches en nucléotides G et C et remédient aux difficultés associées au PCR de gabarits problématiques.

La région génomique des protéines structurales s'étalant de la position 2183 à 3692 (fragment de 1509 bases) a été amplifiée par les amorces PPV-NSXCM1 en amont du codon d'initiation de la VP1 (5'-CAGCAATACGGACACCAAGTCC-3') et PPV-PR36 (5'-CAGTTAGTAGTTTTGGAGGCAGTCC-3'), couvrant ainsi la zone mutationnelle hypothétique.

Brièvement, dans un microtube pour PCR, ont été ajoutés, 1 µl de surnageant de cellules infectées par les virus mutants, 10 µl de tampon PCRx Enhancer Solution 10X (GibcoBRL), 5 µl de tampon *Pfx* Amplification Buffer, 1 mM MgSO₄, 300 µM dNTP, 0,3 µM de la paire d'amorces, 1,25 unités de l'ADN polymérase PLATINUM *Pfx* et 31 µl d'eau distillée (stérile). Le mélange réactionnel a ensuite été déposé dans un thermocycleur Hybaid et a été chauffé à 94°C pendant 2 minutes (départ "hot start"). Le mélange réactionnel a été soumis au programme d'amplification suivant: dénaturation 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 55°C pour permettre l'appariement des amorces et 90 secondes à 68°C pour permettre la synthèse de l'ADN. Ce cycle a été répété 30 fois. Finalement, une élongation de 10 minutes à 72°C a permis d'allonger les brins incomplets d'ADN nouvellement synthétisés.

Les produits de PCR obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v). Les produits de PCR de taille de 1509 pb identifiés sur le gel ont été excisés et purifiés à l'aide de la trousse "High Pure PCR Product Purification Kit" (Boehringer Mannheim). Le protocole fourni avec la trousse de purification a été suivi. L'ADN purifié a par la suite été séquencé à l'aide de l'amorce PPVP15 (5'-GCCTCGAGATGGCGCCTCCTGCAAAAAG-3').

RÉSULTATS

1. CLONAGE DU GÈNE CODANT POUR LA VP2

Toute tentative d'expression d'un gène dans un système hétérologue nécessite: 1) le gène d'intérêt; 2) un vecteur de transfert et 3) un organisme qui pourra fournir tous les outils nécessaires gérant les mécanismes de transcription et de traduction du gène d'intérêt.

1.1 Amplification du gène VP2

La première étape consistait à amplifier l'ADN codant pour la protéine VP2 débutant à la région du génome du PPV régulée par le promoteur P40 (région des protéines structurales). Les produits d'amplification du gène VP2 obtenus pour les souches NADL-2 et Kresse du PPV sont représentés à la figure 12. Un fragment d'ADN d'environ 1700 pb, correspondant au cadre de lecture ouvert de la VP2, a été observé pour les deux souches.

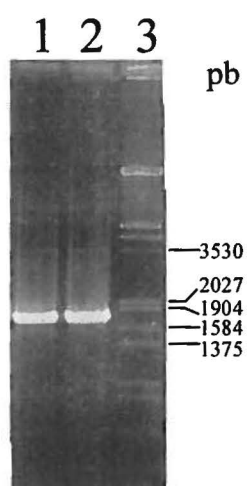
1.2 Clonage dans le vecteur pUCBM20

L'insertion du gène amplifié de la VP2 (souches Kresse et NADL-2) dans le vecteur pUCBM20 permettait une production illimitée de l'ADN codant pour la VP2 et permettait du même coup, la construction d'une matrice vectorielle pour les réactions de séquençage. Le cadre de lecture ouvert de la VP2 a été cloné dans le vecteur pUCBM20 aux sites de restriction *BamH* I et *EcoR* V.

Les recombinants ont tout d'abord été sélectionnés par une extraction rapide d'ADN (LeGouill *et al.*, 1994). À la suite d'une minipréparation d'ADN, les clones recombinants identifiés ont été clivés par les enzymes *BamH* I et *EcoR* V et analysés sur gel d'agarose. La présence d'un fragment d'environ 1700 pb (VP2) et d'un de 2722 pb (vecteur pUCBM20 linéarisé) a été observée pour plusieurs clones, ce qui confirmait l'insertion de l'ADN de la VP2 dans ces derniers (figure 13).

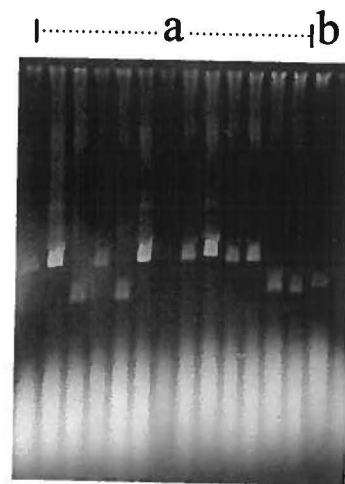
Figure 12: Profil électrophorétique des produits d'amplification du gène VP2 des souches Kresse et NADL-2 du parvovirus porcin

Puits: 1: produits d'amplification de la VP2 (souche Kresse)
 2: produits d'amplification de la VP2 (souche NADL-2)
 3: marqueur de taille

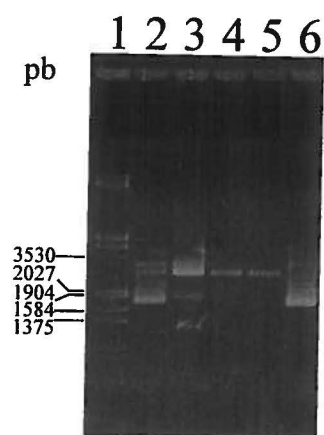




(A)



(B)



1.3 Séquençage

Des clones recombinants identifiés, deux ont été séquencés et comparés à la séquence nucléotidique de la VP2 des souches Kresse et NADL-2 respectivement. Ces deux clones ne démontraient aucune différence d'a.a. avec les souches-mères. Le séquençage a également permis de constater que les codons d'initiation (ATG) et de terminaison (TAG) étaient présents. Les sites de restriction *Kpn* I et *Xba* I, respectivement en aval et en amont du cadre de lecture de la VP2, étaient également présents. Ces sites permettaient un clonage directionnel dans le vecteur d'expression pPICZB de la levure *Pichia pastoris*.

2. CLONAGE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pPICZB

Le gène de la VP2, ayant été cloné dans le vecteur pUCBM20, a pu être amplifié puis digéré aux sites enzymatiques *Kpn* I et *Xba* I pour permettre l'insertion dans le vecteur d'expression pPICZB de la levure *Pichia pastoris*. Les clones recombinants, identifiés de la même façon qu'à la section précédente, ont été séquencés à leurs extrémités, ce qui a démontré que les sites d'initiation (ATG) et de terminaison (TAG) étaient intacts.

3. TEST D'EXPRESSION DANS LA LEVURE *PICHIA PASTORIS*

3.1 Transformation des levures

La cassette d'expression des clones pPICZB/VP2 s'intègre au génome de la levure par double croisement ("double cross-over"). L'endonucléase de restriction *Pme* I facilite cette intégration en linéarisant la cassette d'expression. Suite à une telle linéarisation, les souches GS115 et KM71 de la levure *Pichia pastoris* ont été transfectées par l'ADN des clones pPICZB/VP2.

3.2 Analyse des recombinants par réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Afin de s'assurer que la cassette d'expression du gène VP2 des clones pPICZB/VP2 était intégrée dans le génome de la levure, une réaction de PCR avec amorces internes spécifiques à la VP2 (PPV-PR27 et PPV-PR36) a permis d'identifier plusieurs levures recombinantes (figure 14). Seuls les clones positifs ont été retenus pour l'analyse expressionnelle.

3.3 Test de production protéique de la VP2

Plusieurs clones (positifs à la réaction de PCR) ont été testés pour la production de la protéine VP2 dans la levure *Pichia pastoris*. Le criblage de clones d'expression a été réalisé en fonction d'une cinétique d'expression échelonnée sur 4 journées où des échantillons ont été prélevés toutes les 12 heures. Ce criblage nécessitait donc l'analyse des clones à différents temps après induction. De façon généralisée, l'analyse de ces clones sur gel d'acrylamide a démontré l'absence d'une bande à 64 kDa, représentant la VP2 (figure 15). Grâce à l'utilisation d'un contrôle d'expression fourni par la compagnie Invitrogen® (souche GS115/pPICZ/ β -galactosidase) les conditions d'expression se sont avérées bonnes, car une bande à 116 kDa, correspondant à la β -galactosidase monomérique, pouvait être identifiée sur gel dans tous les tests d'expression effectués.

3.4 Détection des capsides recombinantes

Suite à une détection infructueuse de la protéine VP2 sur SDS-PAGE, d'autres méthodes de détection ont été testées. Des essais préliminaires ont indiqué que des VLP du PPV pouvaient être détectées en quantités infimes, de l'ordre de quelques nanogrammes par cupules, avec le test ELISA. Ce système était donc un outil de détection fort sensible comparativement à l'électrophorèse en SDS-PAGE, en plus de permettre l'analyse simultanée de plusieurs clones à la fois.

Figure 14: Criblage des levures recombinantes par réaction de polymérase en chaîne (PCR)

Visualisation après électrophorèse sur gel d'agarose 2,0 % (p/v) des fragments d'ADN de 400 pb obtenus après amplification.

Puits:	1: marqueur de taille	11: échantillon 8
	2: échantillon 1	12: échantillon 9
	3: échantillon 2	13: échantillon 10
	4: échantillon 3	14: échantillon 11
	5: échantillon 4	15: échantillon 12
	6: échantillon 5	16: échantillon 13
	7: échantillon 6	17: échantillon 14
	8: témoin (-): H ₂ O	18: échantillon 15
	9: témoin (+): PPV	19: échantillon 16
	10: échantillon 7	20: témoin (-): pPICZB

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

pb

653
517
452
394

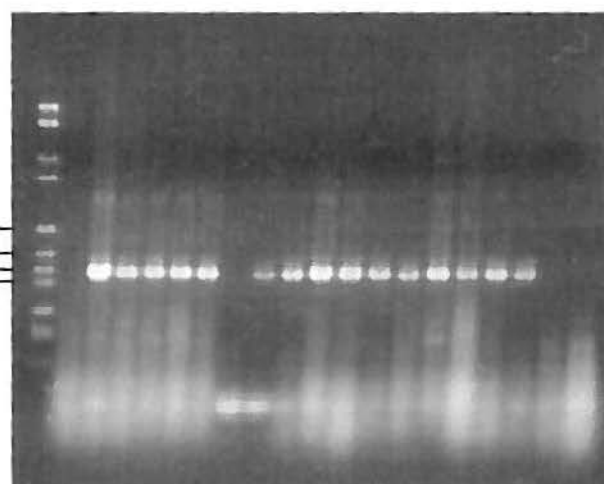


Figure 15: Électrophorèse de protéines après induction de levures contenant la cassette d'expression pPICZB/VP2

- Puits:
- 1: pPICZ/ β -galactosidase (témoin positif), 60 hres p.i.
 - 2: pPICZ/ β -galactosidase (témoin positif), 83 hres p.i.
 - 3: marqueur de poids moléculaire
 - 4: levure sauvage (témoin négatif)
 - 5: pPICZB/VP2, 6 hres post-induction
 - 6: pPICZB/VP2, 12 hres post-induction
 - 7: pPICZB/VP2, 24 hres post-induction
 - 8: pPICZB/VP2, 36 hres post-induction
 - 9: pPICZB/VP2, 48 hres post-induction
 - 10: pPICZB/VP2, 60 hres post-induction
 - 11: pPICZB/VP2, 72 hres post-induction

kDa

200

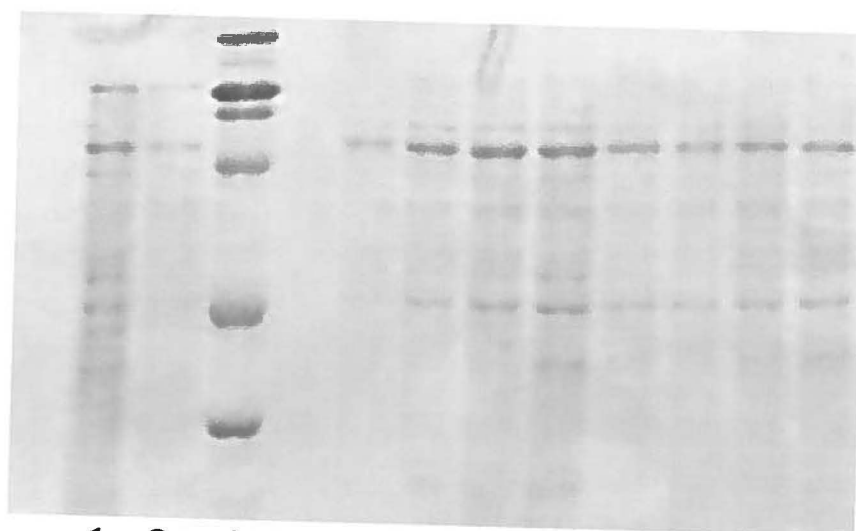
116

97

66

45

31



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Le test en ELISA sur différents lysats cellulaires de levures recombinantes n'a toutefois pas permis d'identifier un clone qui exprimait des capsides recombinantes dans la levure *Pichia pastoris*.

Afin d'étudier davantage la production de capsides recombinantes dans le système d'expression *Pichia pastoris*, quelques échantillons de clones différents furent analysés en microscopie électronique sous la tutelle de Robert Alain du Service de microscopie de l'Institut Armand-Frappier. Après analyse de plusieurs échantillons, aucune grille ne démontrait la présence de particules d'environ 22 nm, correspondant à des capsides recombinantes du PPV.

4. ANALYSE TRADUCTIONNELLE DE LA VP2

L'absence de production de capsides recombinantes ou de la protéine VP2 seule dans la levure *Pichia pastoris* était énigmatique. La région nucléotidique codante de la protéine VP2 avait été séquencée et ne démontrait aucune substitution, ni délétion de nucléotides qui aurait pu changer le cadre de lecture. Les codons d'initiation et d'arrêt de la traduction avaient également été retrouvés intacts dans la construction de la cassette d'expression. Un problème se situait fort probablement au niveau de la machinerie de transcription ou de traduction de la levure, ce qui expliquerait la difficulté d'obtenir des capsides recombinantes dans ce système. Pour pallier aux problèmes d'expression, il fallait tout d'abord identifier à quel niveau la production protéique était bloquée.

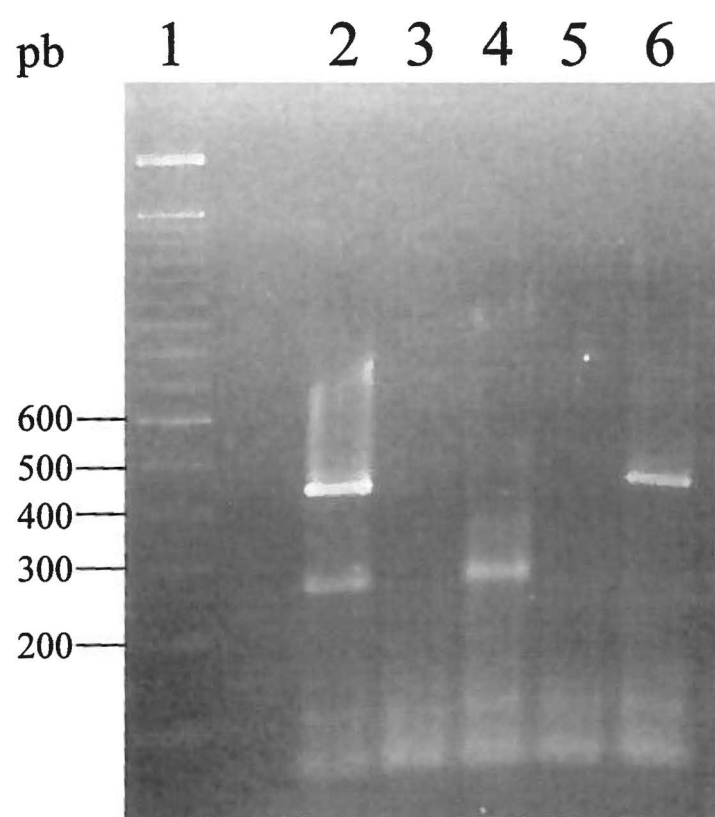
C'est la détection du transcrit de la VP2 qui permettra de déterminer si le problème survient au niveau transcriptionnel ou traductionnel. L'expérience réalisée avait pour but de prouver la production du transcrit de la VP2 dans la levure *Pichia pastoris*. L'ARN total de levures recombinantes a été extrait puis converti en ADN_c. Des amplicons d'environ 420 pb ont été obtenus des ADN_c de levures recombinantes, permettant d'affirmer que le transcrit de la VP2 était bel et bien produit (figure 16).

Figure 16: Transcrit d'ARN de l'insert VP2 à partir d'un recombinant *Pichia pastoris*

Détection du transcrit VP2 par réaction de polymérase en chaîne sur gabarit d'ADN_c à l'ARN total de levure. Des contrôles adéquats ont été utilisés pour cette expérience. L'absence de produits d'amplification pour la levure recombinante sans traitement à la transcriptase inverse était la preuve que l'ADN amplifié était spécifique à l'ARN du transcrit. La levure sauvage ne montrait pas de produits d'amplification, démontrant la spécificité de la réaction. Dans cette expérience, le virus sauvage a été utilisé comme témoin positif de la réaction de PCR.

- Puits:
- 1: marqueur de poids moléculaire
 - 2: levure recombinante transcriptase inverse (+)
 - 3: levure recombinante transcriptase inverse (-)
 - 4: levure sauvage transcriptase inverse (+)
 - 5: témoin négatif (H₂O)
 - 6: témoin positif (virus sauvage)

note: Un produit d'amplification non spécifique d'environ 280 pb est retrouvé pour la levure recombinante et la levure sauvage.



À la lumière de ces résultats, il pouvait être supposé qu'un problème de traduction de la VP2 dans *Pichia pastoris* était probablement la cause des difficultés de production de capsides recombinantes dans cette levure.

5. GÈNE PARTIELLEMENT SYNTHÉTIQUE DE LA VP2

5.1 Construction du gène partiellement synthétique

L'obtention du fragment synthétique consistait à assembler tous les oligonucléotides dans une réaction de PCR, suivie d'une seconde amplification à l'aide d'amorces spécifiques donnant un produit d'amplification d'environ 400 pb sur gel d'agarose 2,0 % (p/v) (figure 17).

5.2 Clonage

L'insertion du fragment synthétique dans le vecteur pGEM®-T a permis le séquençage du fragment entier à l'aide de l'amorce SP6. Toutes les modifications apportées aux oligonucléotides formant le fragment synthétique ont été respectées. Le fragment a par la suite été digéré par les enzymes *Bam*H I et *Bst*X I pour permettre l'insertion dans le vecteur pUCBM20/VP2 (souche Kresse/NADL-2) duquel le fragment original *Bam*H I-*Bst*X I avait préalablement été retiré. Par la suite, le nouveau gène VP2 synthétique a été cloné dans le vecteur d'expression pPICZB pour ensuite produire des levures recombinantes.

5.3 Expression de la VP2 synthétique

Les conditions d'expression de la VP2 synthétique étaient les mêmes qu'à la section 3. Plusieurs analyses d'expression ont été réalisées sur gel SDS-PAGE, ce qui a permis de constater qu'aucune protéine de 64 kDa (poids moléculaire de la protéine VP2) n'était présente sur gel (figure 18).

Figure 17: Visualisation sur gel d'agarose d'un fragment synthétique du gène de la VP2 après amplification par PCR

Puits: 1: marqueur de taille
 2: fragment synthétique non purifié
 3: fragment synthétique purifié

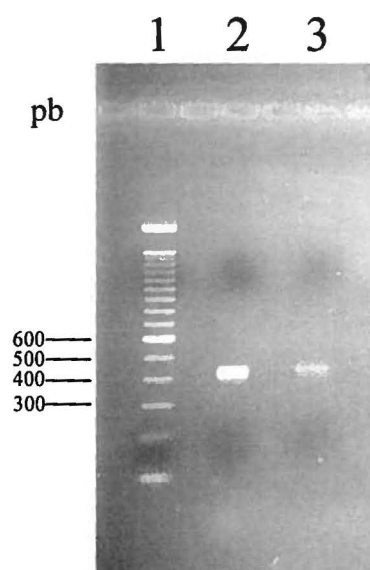


Figure 18: Électrophorèse de protéines après induction de levures contenant la cassette d'expression pPICZB/VP2 (Kresse) synthétique

- Puits:
- 1: levure sauvage (GS115), 42 hres p.i.
 - 2: pPICZ/ β -galactosidase (témoin positif), 42 hres p.i.
 - 3: marqueur de poids moléculaire
 - 4: pPICZB/VP2 synth., 48 hres post-induction
 - 5: pPICZB/VP2 synth., 48 hres post-induction
 - 6: pPICZB/VP2 synth., 48 hres post-induction
 - 7: pPICZB/VP2 synth., 48 hres post-induction
 - 8: levure sauvage (GS115), 58 hres p.i.
 - 9: pPICZ/ β -galactosidase (témoin positif), 58 hres p.i.
 - 10: pPICZB/VP2 synth., 64 hres post-induction
 - 11: pPICZB/VP2 synth., 64 hres post-induction
 12. pPICZB/VP2 synth., 64 hres post-induction
 13. pPICZB/VP2 synth., 64 hres post-induction
 14. levure sauvage (GS115), 64 hres post-induction
 15. pPICZ/ β -galactosidase (témoin positif), 64 hres p.i.

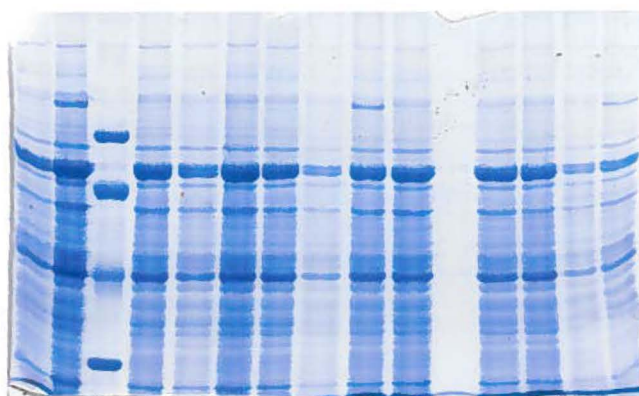
kDa 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

97

66

45

31



Les conditions d'expression étaient jugées bonnes car l'analyse sur gel de contrôles positifs exprimant la β -galactosidase a démontré la présence de cette protéine. Soupçonnant la faible sensibilité de l'électrophorèse en SDS-PAGE, une immunodétection de la protéine VP2 a été tentée sur des protéines recueillies à partir de levures recombinantes.

5.4 Immunodétection

Les protéines obtenues lors de la cinétique d'expression de la VP2 synthétique ont été transférées sur une membrane de PVDF afin qu'un anticorps monoclonal de souris (3C9-D11-H11) dirigé contre les protéines structurales du PPV puisse détecter une éventuelle production de cette protéine dans la levure *Pichia pastoris* (figure 19). Seules les protéines de la capside du virus sauvage (témoin positif de l'immunodétection) ont pu être détectées par l'anticorps monoclonal 3C9 (VP1, 84 kDa et VP2, 64 kDa). Ces résultats ont suggéré deux conclusions: 1) le système de transfert et d'immunodétection de protéines spécifiques était au point et 2) l'incapacité de détecter la protéine VP2 synthétique dans la levure *Pichia pastoris* démontrait que ce système d'expression était problématique quant à la production de la protéine VP2. Sans doute plusieurs facteurs sont à considérer pour expliquer ces résultats, ceux-ci seront analysés en détail dans la prochaine section.

6. PRODUCTION DE CAPSIDES RECOMBINANTES DANS BACULOVIRUS

C'est finalement par le biais du système d'expression du baculovirus qu'une production de particules recombinantes a pu être obtenue. Après analyse de l'électrophorèse des protéines purifiées sur un gradient de sucrose, une bande a pu être observée à environ 64 kDa correspondant à la protéine VP2, qui est une sous-unité de la capside (figure 20a). La protéine VP2 a pu être produite dans ce système d'expression et l'auto-assemblage de cette protéine en capside recombinante a été analysé en microscopie électronique. La microphotographie (figure 20b) d'une image prise en microscopie électronique et grossie plus de 100 000 fois a révélé la présence de particules recombinantes vides d'échantillons

Figure 19: Immunodétection des protéines produites dans la levure recombinante *Pichia pastoris* contenant la cassette d'expression pPICZB/VP2 synthétique

Les bandes apparaissant sur le gel sont des protéines reconnues par l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 qui est spécifique aux protéines structurales du PPV.

- Puits:
- 1: pPICZB/VP2 synth., 42 hres post-induction
 - 2: pPICZB/VP2 synth., 48 hres post-induction
 - 3: marqueur de poids moléculaire
 - 4: capside vide
 - 5: virus sauvage
 - 6: virus sauvage

kDa

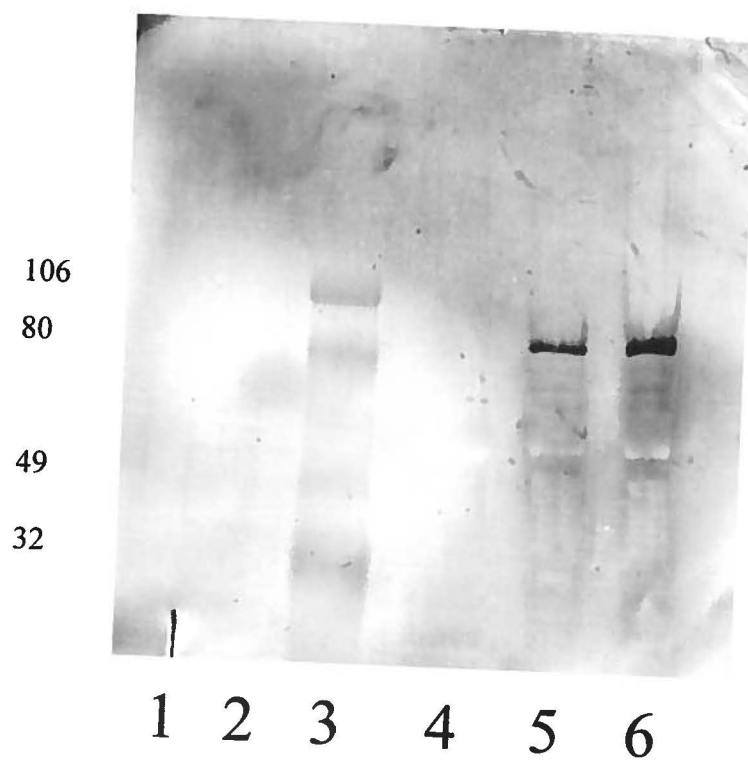


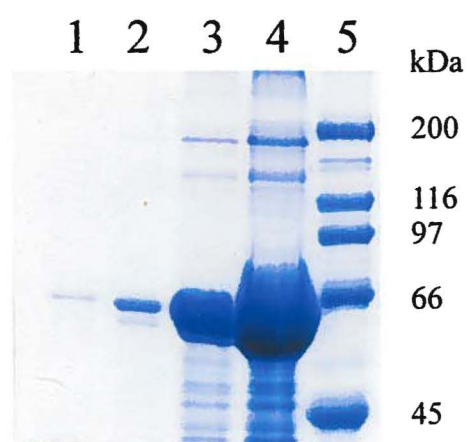
Figure 20: Analyse de l'expression de la protéine VP2 du PPV dans le système d'expression du baculovirus et de son auto-assemblage en particules recombinantes vides

(A) Profil électrophorétique d'échantillons protéiques purifiés de cellules d'insectes contenant le bacmide recombinant du gène de la VP2.

Puits: 1: échantillon dilué 1000 fois
 2: échantillon dilué 100 fois
 3: échantillon dilué 10 fois
 4: échantillon non-dilué
 5: marqueur de poids moléculaire

(B) Microphotographie d'une image prise en microscopie électronique (agrandie 120 000 fois) de particules recombinantes d'environ 22 nm correspondant à des capsides vides du PPV. Cet échantillon a été obtenu à partir de cellules d'insectes produisant la protéine VP2 analysée préalablement sur gel SDS-PAGE.

(A)



(B)



(120 000X)

purifiés à partir de cellules porteuses du bacmide où le gène codant pour la VP2 avait été inséré. Ces capsides recombinantes ont été utilisées comme molécules cibles pour toutes les expériences subséquentes d'affichage du bactériophage.

7. SÉLECTION DE PEPTIDES D'AFFINITÉ ENVERS LES VLPs DU PPV

Il a été noté (revue bibliographique) que les protéines structurales des parvovirus sont impliquées dans le spectre d'hôte, le tropisme cellulaire, et dans la réaction immunitaire. L'importance des protéines VP ne fait pas exception chez le PPV. Toutefois, conséquence probable du manque d'anticorps monoclonaux dirigés contre le PPV disponibles à l'heure actuelle, la cartographie des épitopes du PPV est fort difficile. Pour pallier au manque d'anticorps monoclonaux et aux connaissances insuffisantes concernant les épitopes importants du PPV, il a été décidé d'identifier des séquences peptidiques de hautes affinités envers les capsides du PPV, par l'entremise de bibliothèques peptidiques présentées en surface de phages. Ces peptides pourraient devenir d'excellents outils dans l'étude de l'infection du PPV.

Au total, cinq bibliothèques différentes ont été utilisées dans le processus de sélection de peptides dirigés contre la capside recombinante du PPV. Trois rondes de sélection ont été réalisées sur des VLPs du PPV (structurellement et antigéniquement semblables aux virus natifs) immobilisées sur une plaque de plastique. Les phages élués ont été utilisés pour infecter la souche ER2537 d'*E. coli*.

7.1 Enrichissement en phages spécifiques

Le moyen le plus rapide et efficace de vérifier la spécificité des phages sélectionnés à travers chaque ronde, est le calcul du rendement. Ce dernier se définit comme le rapport du nombre de phages élués après chaque ronde de sélection sur le nombre total de phages utilisés pour l'expérience. L'enrichissement du rendement d'un facteur de 1000 entre chaque ronde est souhaitable.

Dans les expériences effectuées avec des plaques multi-puits, aucun enrichissement entre les rondes de sélection n'a été observé (tableau 8). Ces résultats suggérèrent deux hypothèses soient: 1) que l'absence d'enrichissement est probablement le résultat d'un avantage de réplication des phages non-spécifiques envers les phages spécifiques ou 2) que des phages non-spécifiques se lient au plastique des plaques, phénomène commun qui a déjà fait l'objet d'une publication scientifique (Adey *et al.*, 1995).

7.1.1 Spécificité des phages isolés

C'est d'ailleurs pour vérifier la spécificité des phages qu'un test ELISA a été réalisé en utilisant des capsides recombinantes du PPV comme antigènes-cibles et un anticorps anti-M13 couplé à la peroxydase pour la détection colorimétrique. Malheureusement, aucun clone positif n'a pu être identifié à l'aide de ce test. Néanmoins, certains clones dont les densités optiques observées en ELISA étaient supérieures à la moyenne ont été propagés en cellules bactériennes et leur ADN a été séquencé.

Au total, 19 clones ont été séquencés. Il n'existait aucun motif peptidique commun parmi tous les clones, à l'exception des clones 8 et 9 et des clones 16 et 17 qui étaient des duplicatas d'une même séquence peptidique (tableau B). L'analyse de la composition en a.a. révéla, par contre, que tous les clones étaient majoritairement composés d'a.a. aromatiques (notamment F,Y,W,H). La présence de ces résidus implique souvent l'isolement de phages qui se lient au plastique, tel que rapporté par la compagnie New England Biolabs et par Adey et ses collaborateurs (1995).

Tableau 8: Exemples de rendement de différentes librairies peptidiques en fonction de la ronde de sélection en phages spécifiques

Les différentes librairies ont été testées sur des capsides recombinantes dans des cupules de plaques de plastique.

Le nombre initial de phages (2×10^{11}) a été maintenu constant pour chacune des différentes expériences.

RENDEMENT*			
Ronde de sélection	Librairie Ph.D.-7™	Librairie pVIII 9 aa. Cys	Librairie Ph.D.-12™
1	$2,86 \times 10^{-6}$	$3,00 \times 10^{-8}$	$6,80 \times 10^{-7}$
2	$9,00 \times 10^{-6}$	$7,40 \times 10^{-9}$	$2,50 \times 10^{-6}$
3	$1,05 \times 10^{-7}$	$5,00 \times 10^{-8}$	$2,00 \times 10^{-6}$

*Le rendement est défini comme étant le nombre de phages spécifiques (fraction d'élution) par rapport au nombre initial de phages utilisés lors de la sélection

Tableau 9: Séquences des peptides isolés sur plaques multi-puits à l'aide de la librairie Ph.D.-7™

CLONES	SÉQUENCES PEPTIDIQUES
1	TQTLHTP
2	KVVTLHQ
3	AVSASTL
4	TLNGYGS
5	LCCYPPS
6	KLWVIPQ
7	NLSHPMH
8	FNSHAHW
9	FNSHAHW
10	WPFHHHR
11	MPHIHRH
12	IHHRPGL
13	AHTLRTG
14	HASKQLL
15	RLLPRPG
16	FHWRWVP
17	FHWRWVR
18	WEPPWRS
19	WHKHLPK

7.2 Affichage du bactériophage: nouvelle méthodologie

Suite à de premières tentatives infructueuses quant à la sélection de peptides d'affinité envers les VLPs du PPV, une alternative à la méthodologie conventionnelle était de mise. L'alternative utilisée, afin de tenter d'éliminer une population majoritaire de phages non-spécifiques, fut d'utiliser des plateaux de 60 mm au lieu de plaques multi-puits lors des épreuves de sélection. Ces plateaux (Falcon 1034) étaient fortement recommandés par le docteur Belhumeur de l'Université de Montréal.

Une expérience préliminaire fut réalisée à l'aide d'un contrôle (streptavidine) fourni par le fabricant de la librairie (New England Biolabs). Le consensus de peptides qui se lie à cette molécule est connu: S/TLL/IAHPQ (Devlin *et al.*, 1990). Cette approche a été réalisée avec les nouveaux plateaux. Le consensus peptidique de la streptavidine a été repéré dans les séquences peptidiques des phages isolés, ce qui donna le feu vert pour l'utilisation de VLPs du PPV à l'aide de ce système.

7.2.1 Enrichissement en phages spécifiques

Pour cette expérience, la librairie Ph.D.-12™ a été utilisée. Une augmentation du rendement de l'ordre de 10^5 entre la première et la deuxième ronde a été observée, traduisant un enrichissement en phages spécifiques (Tableau 10). Le passage de la seconde à la troisième ronde s'est traduit en une légère augmentation du rendement. En général, le rendement fut nettement amélioré comparativement à l'utilisation de plaques à multi-puits (le rendement était 10^4 fois plus élevé). En tout, 14 clones ont été choisis au hasard afin d'en déterminer la composition en a.a., par séquençage nucléotidique.

Tableau 10: Rendement des phages sélectionnés avec des capsides recombinantes du PPV en utilisant des plateaux de 60 mm

Un enrichissement notable du rendement de la première à la deuxième ronde de sélection est synonyme d'un enrichissement en phages spécifiques aux capsides recombinantes du PPV.

RENDEMENT*	
Ronde de sélection	
1	$6,50 \times 10^{-10}$
2	$1,28 \times 10^{-5}$
3	$1,00 \times 10^{-5}$

*Le rendement est défini comme étant le nombre de phages spécifiques (fraction d'élution) par rapport au nombre initial de phages utilisés lors de la sélection

7.2.2 Spécificité des phages isolés

Suite au séquençage de différents clones isolés et à l'analyse des a.a. constituant chaque clone, plusieurs conclusions ont pu être tirées. Dans un premier temps, on ne pouvait parler d'un consensus en a.a. général observé pour ces clones, mais plutôt de fortes similarités pour certains groupes de clones (tableau 11). En effet, la séquence en a.a. du clone 12.1 est retrouvée dans 6 des 14 clones (43 %). Les clones 12.3 et 12.4, quant à eux, démontrent un consensus IHXXS, où X représente les a.a. P, Q ou S. Les autres clones ne démontrèrent aucun consensus entre eux.

7.2.3 ELISA sur clones sélectionnés

Face à cette diversité de peptides, il se fallait de déterminer la spécificité de chacun des clones à l'aide d'un test ELISA. Dans cette expérience, chaque clone est amené à s'attacher à des capsides recombinantes du PPV fixées à une plaque de 96-puits. Un anticorps anti-M13 couplé à la peroxydase permet de détecter l'interaction par le biais du substrat colorimétrique OPD. Des puits contrôles contenant soit des phages non-spécifiques ou du coliphage M13 sauvage ont permis d'évaluer le bruit de fond de la détection ainsi que de déterminer le seuil de positivité de la réaction.

La forte positivité des clones 12.1, 12.2, 12.3 en test ELISA (figure 21), suggère que ces phages portent à leur surface des séquences peptidiques de forte affinité envers la capside du PPV. Étant donné la différences des a.a. constituant ces clones, il est fort possible que ces peptides lient des régions de la capside différentes du site d'attachement de l'anticorps monoclonal 3C9 car tous ces clones, mis en présence des capsides, ne diminuèrent pas le signal en ELISA du 3C9. Ces résultats démontrent que différents peptides peuvent interagir (ou ont une grande affinité) avec divers sites de la capside.

Tableau 11: Séquences des peptides isolés sur plateau de culture de 60 mm à l'aide de la librairie Ph.D.-12™

CLONES	FRÉQUENCE ^a	SÉQUENCES PEPTIDIQUES ^b
12.1	6	ATNYRSQMPLLT
12.2	1	SLNAKKPQALHW
12.3	1	IHPQSGWLPPLR
12.4	1	IHQSSPTTAGQP
12.7	1	SPMSPAQVLTWP
12.10	1	LFPSTLLTVLK
12.11	1	TLPIILHRSMLEP
12.12	1	NHNLATWPHLLH
12.13	1	RTAQELTASSHT

^a La fréquence est le nombre de séquences identiques obtenues pour un même clone.

^b Les séquences peptidiques sont agencées selon le degré de similitude des a.a. d'un clone à l'autre.

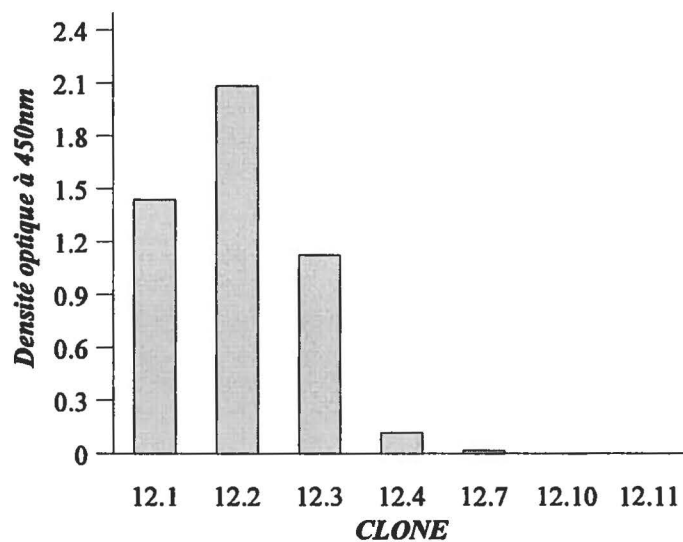


Figure 21: Détection de VLPs du PPV à l'aide de peptides monoclonaux exposés en surface de phage

Des VLPs (100 µg/ml) furent immobilisées sur une plaque ELISA et détectées en utilisant environ $2,4 \times 10^8$ phages pour chaque clone. Les densités optiques ont été mesurées après une incubation de 10 minutes avec le substrat OPD. Un bruit de fond de 0,141, obtenu avec des phages non-spécifiques, a été soustrait des densités optiques produites par les phages spécifiques.

8. MUTANTS ÉCHAPPATOIRES

Les expériences des mutants échappatoires visaient à identifier, par l'entremise de virus pouvant échapper à la neutralisation par un anticorps monoclonal, des déterminants du PPV impliqués dans la réponse immunitaire.

8.1 Unités de fluorescence focale des mutants échappatoires

Le nombre de génomes viraux équivalents initial utilisé pour l'infection dans chaque ronde de culture en cellules PT a été conservé. Le titre viral du PPV a été calculé après chaque passage sous forme d'un rapport entre le nombre d'unités de fluorescence focale (ffu) détectées à l'aide d'anticorps polyclonaux porcins sur le nombre de fffu détectées par l'anticorps neutralisant 3C9-D11-H11. Cette méthode permettait de suivre l'évolution des mutants après chaque passage avec le 3C9-D11-H11. Plus le rapport est élevé, plus la population virale est enrichie en mutants qui échappent à la reconnaissance par l'anticorps monoclonal. Après chaque ronde, une augmentation du rapport en fffu a été observée (tableau 12). Après le cinquième passage, des dilutions des virus mutants ont été effectuées pour l'infection de cellules PT en présence du 3C9-D11-H11 afin d'obtenir des populations uniformes de mutants exempts de virus NADL-2 sauvage. Des clones viraux mutants ont été sélectionnés par visualisation en microscopie à fluorescence: ces derniers étaient négatifs (aucune fffu) lorsque détectés au moyen du 3C9, mais répondaient positivement (plusieurs fffu) lorsque les anticorps polyclonaux porcins étaient utilisés.

8.2 Quantification des molécules virales

Dans cette expérience, nous voulions quantifier l'effet neutralisant de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 dirigé contre le PPV sur le virus NADL-2 après trois passages en cellules PT en présence de l'anticorps, comparativement à l'effet neutralisant sur une population de virus NADL-2 sauvage non mutante. Nous voulions également vérifier le

nombre de génomes viraux de départ des deux différentes populations afin d'effectuer des tests en immunofluorescence indirecte avec le même nombre de molécules virales pour ces deux populations virales différentes. Une réaction de PCR quantitatif-compétitif a été réalisée avec succès à l'aide d'un standard interne, le mimic. Les résultats de cette expérience (figures 22 et 23) ont démontré qu'après trois passages du PPV, en cellules PT et en présence du 3C9, la population virale était devenue insensible aux effets neutralisants de cet anticorps. Par contre, le virus sauvage était très sensible à cette neutralisation comme le démontre la réduction du nombre de génomes équivalents, de l'ordre de près de 10^3 , suite à l'ajout de l'anticorps. Dans cette expérience, la concentration de génomes équivalents utilisée au départ était la même pour les deux populations virales soit d'environ $2,4 \times 10^8$ molécules/ μ l de surnageant viral.

8.3 PCR sur mutants échappatoires

L'ADN viral des clones sélectionnés par immunofluorescence (section 8.1) a été amplifié, donnant des fragments d'amplification de 1509 pb (figure 24). L'ADN a été purifié et séquencé à l'aide de l'amorce PPV-VP15. L'analyse de trois mutants a révélé qu'une seule mutation sur un des clones. La mutation a eu comme effet de changer la base thymine (T) pour la base guanine (G) (position 2875 du génome du PPV) changeant ainsi l'a.a. asparagine par une lysine (N—>K). Cette mutation se trouve juste en amont d'une série de 9 glycines consécutives communément appelée le "G stretch".

Tableau 12: Titre viral des mutants échappatoires déterminé par unités de fluorescence focale (ffu) après chaque ronde de sélection

Le tableau décrit un rapport ffu établi à l'aide d'anticorps différents. Un rapport élevé signifie qu'une forte population virale est insensible (mutante) à la reconnaissance par l'anticorps neutralisant 3C9-D11-H11. L'augmentation du rapport des ffu traduit la pression sélective des mutants échappatoires au détriment du virus sauvage NADL-2.

RONDE	FFU (ANTICORPS POLYCLONAUX)/FFU (ANTICORPS MONOCLONAL 3C9-D11-H11)
1	1,63
2	2,11
3	>28,57
4	>75
5	‡

‡: non calculable car le nombre de ffu (anticorps monoclonal 3C9-D11-H11) est nul.

Figure 22: Résultats de l'expérience de Qc-PCR du PPV sauvage

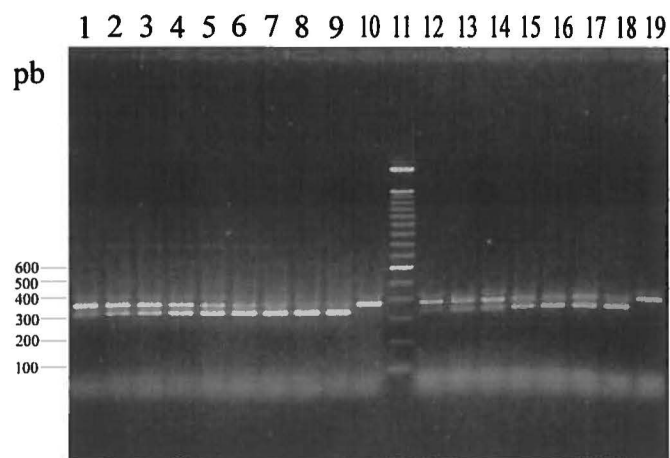
Le nombre de génomes équivalents viraux présents dans le surnageant de culture de cellules PT en présence (ou absence) de l'anticorps monoclonal neutralisant 3C9-D11-H11 a été déterminé dans un Qc-PCR.

(A) Électrophorèse sur gel d'agarose 1,8 % (p/v) des produits du Qc-PCR en présence du standard interne (mimic A) de concentration connue. Il est à noter que les puits 1 à 9 représentent le virus cultivé sans 3C9-D11-H11 et que les puits 13 à 18 représentent le virus cultivé en présence de ce même anticorps.

Puits: 1: 39 amoles du mimic A	10: virus sauvage seulement
2: 78 amoles du mimic A	11: marqueur de taille
3: 156 amoles du mimic A	12: 1,6 amoles du mimic A
4: 312 amoles du mimic A	13: 3,1 amoles du mimic A
5: 625 amoles du mimic A	14: 6,3 amoles du mimic A
6: 1250 amoles du mimic A	15: 12,5 amoles du mimic A
7: 2500 amoles du mimic A	16: 25 amoles du mimic A
8: 5000 amoles du mimic A	17: 50 amoles du mimic A
9: 10 000 amoles du mimic A	18: 100 amoles du mimic A
	19: virus sauvage seulement

(B) Courbe de quantification établie selon les résultats du Qc-PCR. Les résultats sont exprimés dans un rapport entre l'intensité des bandes d'amplification du virus sauvage et l'intensité du standard interne (mimic A) en fonction du logarithme du nombre de molécules du standard. La droite bleue représente le surnageant viral cultivé en présence de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11. La droite de couleur rose représente le surnageant viral cultivé en absence de l'anticorps. Les points sur la droite sont calculés à partir des analyses des produits du Qc-PCR.

(A)



(B)

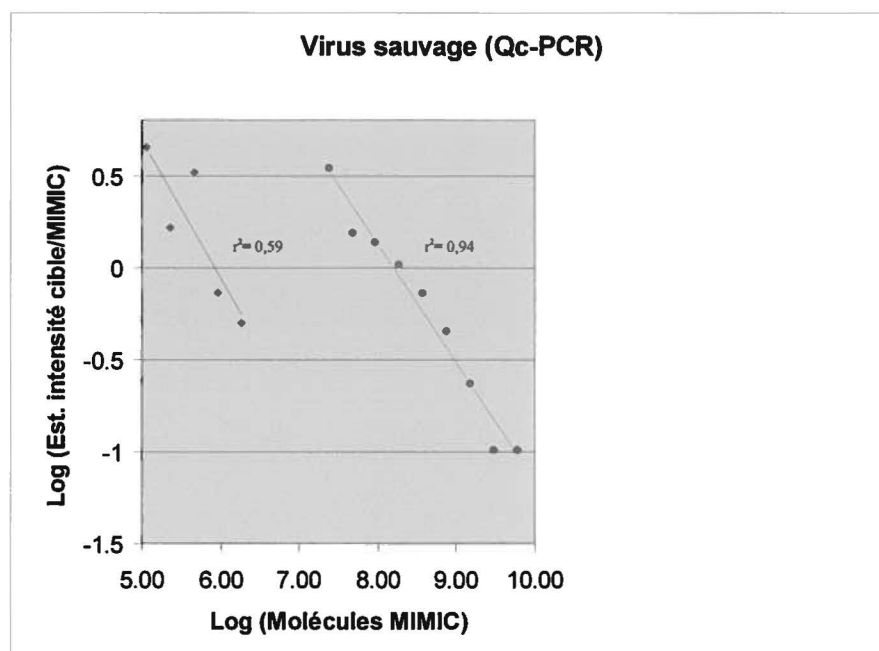


Figure 23: Résultats de l'expérience de Qc-PCR des mutants échappatoires

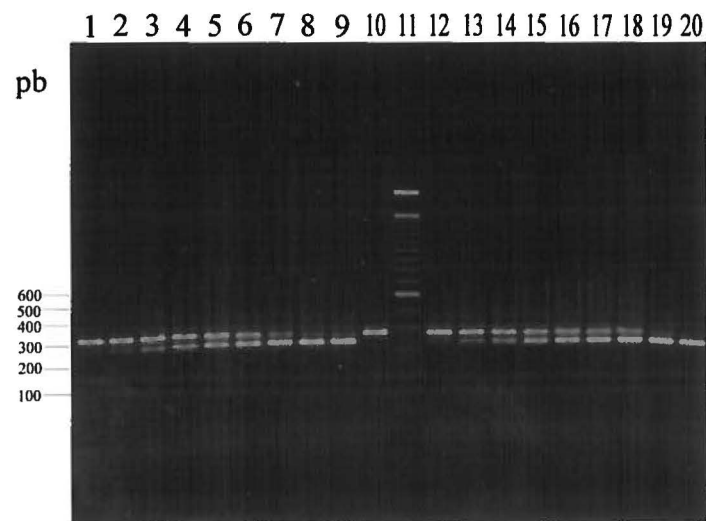
Le nombre de génomes équivalents viraux présents dans le surnageant de culture de cellules PT en présence (ou absence) de l'anticorps monoclonal neutralisant 3C9-D11-H11 a été déterminé dans un Qc-PCR.

(A) Électrophorèse sur gel d'agarose 1,8 % (p/v) des produits du Qc-PCR en présence du standard interne (mimic A) de concentration connue. Il est à noter que les puits 1 à 9 représentent le virus cultivé sans 3C9-D11-H11 et que les puits 12 à 20 représentent le virus cultivé en présence de ce même anticorps.

Puits: 1: 39 amoles du mimic A	11: marqueur de taille
2: 78 amoles du mimic A	12: 39 amoles du mimic A
3: 156 amoles du mimic A	13: 78 amoles du mimic A
4: 312 amoles du mimic A	14: 156 amoles du mimic A
5: 625 amoles du mimic A	15: 312 amoles du mimic A
6: 1250 amoles du mimic A	16: 625 amoles du mimic A
7: 2500 amoles du mimic A	17: 1250 amoles du mimic A
8: 5000 amoles du mimic A	18: 2500 amoles du mimic A
9: 10 000 amoles du mimic A	19: 5000 amoles du mimic A
10: mutants échappatoires	20: 10 000 amoles du mimic A

(B) Courbe de quantification établie selon les résultats du Qc-PCR. Les résultats sont exprimés dans un rapport entre l'intensité des bandes d'amplification des mutants échappatoires et l'intensité du standard interne (mimic A) en fonction du logarithme du nombre de molécules du standard. La droite bleue représente le surnageant viral cultivé en présence de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11. La droite orangée représente le surnageant viral cultivé en absence de l'anticorps. Les points sur la droite sont calculés à partir des analyses des produits du Qc-PCR.

(A)



(B)

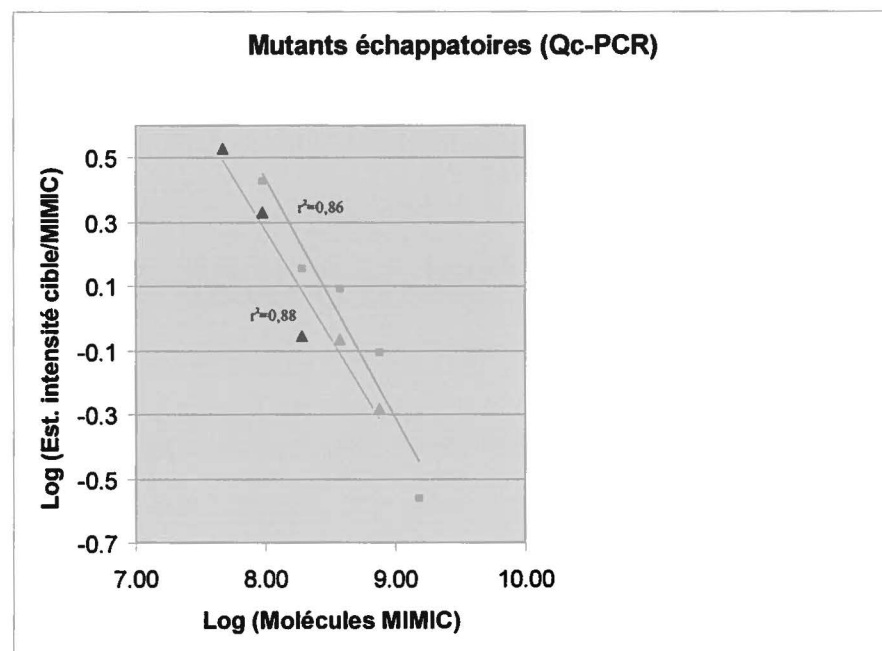
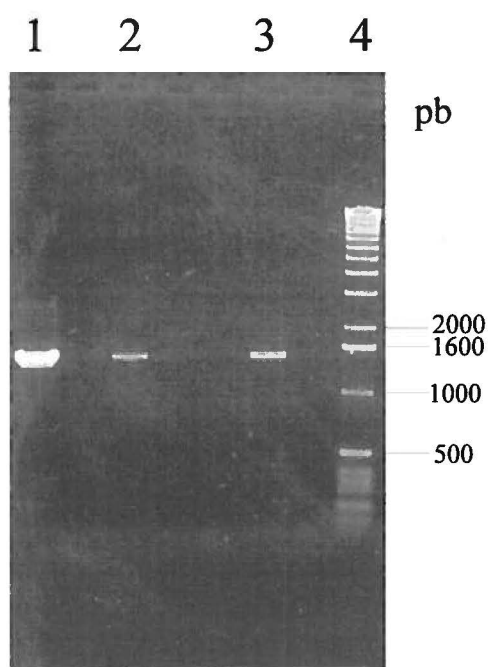


Figure 24: Visualisation sur gel d'agarose d'amplicons obtenus après amplification par PCR de mutants viraux échappatoires

Puits: 1: mutant échappatoire 1
 2: mutant échappatoire 2
 3: mutant échappatoire 3
 4: marqueur de taille



DISCUSSION

CAPSIDES RECOMBINANTES DU PPV DANS *PICHIA PASTORIS*

L'idée première des travaux était de produire des capsides recombinantes du PPV dans la levure *Pichia pastoris*. Aucune capside parvovirale n'ayant été produite dans ce système, cette stratégie se voulait à la fois stimulante et originale. Ce système offrait, en plus des niveaux d'expression élevés, une machinerie post-traductionnelle plus semblable aux cellules de mammifères que ne l'était celle du système d'expression *E. coli*, par exemple. L'aspect rendement, c'est-à-dire la quantité optimale de capsides recombinantes pouvant être produites à de faibles coûts, était également un facteur qui motivait le choix de ce système d'expression. Un système d'expression à haut rendement était vital pour une production de capsides recombinantes en grande quantité afin qu'elles puissent servir de modèles pour la cristallographie du PPV en collaboration avec l'Université de Purdue et de servir de molécules cibles pour étudier les déterminants de surface du PPV. La capside recombinante non infectieuse qui est structurellement et antigéniquement identique à la capside native se veut l'outil idéal pour l'étude structurale des parvovirus.

Le système d'expression de la levure *Pichia pastoris* a déjà été utilisé avec succès pour l'expression de protéines à un rendement pouvant s'élever jusqu'à 12 g/L (Clare *et al.*, 1991). Ce système n'engendre pas des coûts de production importants (milieu de culture cellulaire, par exemple) et il est relativement simple à utiliser. Outre les petits accrocs que représente le clonage dans le vecteur de transfert pUCBM20, les expériences de clonage du matériel codant pour la protéine VP2 dans le vecteur d'expression pPICZB se sont bien déroulées. Le clonage dans le vecteur pUCBM20 rendait l'ADN de la VP2 disponible pour le clonage éventuel dans des vecteurs du système d'expression du baculovirus et de l'adénovirus grâce à la présence de sites de restriction retrouvés dans ces derniers. L'analyse par digestion et par séquençage de l'ADN de la protéine VP2 dans le vecteur pPICZB a démontré la présence des codons d'initiation et de terminaison de traduction ainsi qu'un cadre de lecture intact. Le criblage par PCR de levures ayant incorporé la cassette d'expression intacte dans leur génome a permis de sélectionner les clones d'expression.

Suite à ces analyses, considérant le vecteur d'expression adéquat, les expériences d'expression dans la levure ont été amorcées.

Pour vérifier les conditions d'expression dans la levure *Pichia pastoris*, un contrôle exprimant la β -galactosidase a été utilisé dans chaque cinétique d'expression réalisée avec les clones recombinants VP2. La présence d'une bande protéique du même poids moléculaire que la β -galactosidase a permis de constater que les conditions étaient adéquates. L'utilisation d'un clone contenant uniquement le vecteur pPICZB intégré au génome de la levure a également servi de contrôle d'expression. Une cinétique d'expression, allant parfois même jusqu'à six jours post-induction, permettait d'évaluer à quel moment la production protéique était la plus importante.

L'analyse par électrophorèse des protéines totales des différentes levures recombinantes induites n'a pu démontrer la production de la protéine VP2. Ce résultat laissait présager que la protéine, si elle était produite, l'était à un niveau trop peu élevé pour être détectée par électrophorèse. Dans le but de vérifier s'il y avait formation de capsides recombinantes dans la levure, des lysats cellulaires ont été examinés, parallèlement, en microscopie électronique. L'analyse des microphotographies a permis d'affirmer, d'une part, qu'aucune capsidite n'était présente dans le lysat et d'autre part, que rien ne laissait présager la formation de particules recombinantes incomplètes. Suite à ces résultats, il a été jugé bon de vérifier la production de capsides dans la levure par un test plus sensible: l'ELISA sur lysat cellulaire en utilisant l'anticorps de détection 3C9-D11-H11 qui reconnaît les protéines structurales du PPV. Cette alternative offrait l'avantage de permettre l'analyse simultanée de plusieurs clones tout en étant une technique de détection rapide. Cette expérience a été réalisée en utilisant 1) différentes concentrations de capsides virales natives comme contrôles positifs à la réaction et 2) comme contrôle négatif, un lysat de levure contenant uniquement le vecteur d'expression pPICZB. Suite au test ELISA, les capsides natives ont pu être détectées jusqu'à de très faibles concentrations (nanogrammes) faisant ainsi état de la sensibilité du test.

Par contre, aucun signal positif sur lysat de levures recombinantes n'a pu être détecté traduisant l'absence d'expression de capside ou de protéine VP2.

L'absence de production de la protéine VP2 dans le système de la levure *Pichia pastoris* était problématique. En effet, sachant que le cadre de lecture intact de la protéine était bien intégré dans le génome de la levure, le problème d'expression devait se situer au niveau de la machinerie de transcription ou de traduction de la levure. Afin de cerner l'élément problématique, quelques solutions ont été envisagées. Pour vérifier s'il y avait transcription de la VP2 dans la levure, l'ARN total de clones recombinants a été extrait afin d'amplifier une partie des transcrits de la VP2 dans une réaction de RT-PCR. Pour cette expérience, des contrôles adéquats devaient être effectués afin de prouver la spécificité de la réaction à l'ARN. Dans un premier temps, l'absence d'amplification pour le(s) clone recombinant non traité à la transcriptase inverse a démontré que la réaction à l'ARN du transcrit et non à l'ADN génomique, épargné par le traitement à la DNase était spécifique. De plus, la levure sauvage, ne démontrant pas de produit d'amplification, a prouvé une fois de plus la spécificité de la réaction. Un produit d'amplification du transcrit de la VP2 a été détecté pour la levure recombinante, permettant d'affirmer qu'il y avait transcription de la VP2 et qu'un problème au niveau traductionnel pouvait être la cause des échecs d'expression dans la levure *Pichia pastoris*. La dégradation rapide de la VP2 par des protéases de la levure n'est pas exclue.

Suite aux expériences concluantes de RT-PCR, démontrant la présence de transcrits de VP2, les problèmes d'expression dans la levure se situaient probablement au niveau de la traduction. La traduction protéique comporte beaucoup d'éléments qui impliquent la séquence nucléotidique du gène et la machinerie traductionnelle de la cellule dans laquelle le gène a été incorporé. Il est impossible de contrôler les éléments de la machinerie traductionnelle d'une cellule, étant donné sa grande complexité. Il est toutefois possible de manipuler génétiquement une séquence nucléotidique afin d'optimiser sa transcription et sa traduction dans la cellule-hôte.

Les 400 premiers nucléotides de la séquence de la VP2 contiennent de nombreux codons peu ou pas reconnus par la levure *Pichia pastoris* (tableau 6 de l'approche expérimentale). De plus, cette région est riche en bases A et T, ce qui peut conduire à une terminaison prématurée de transcrits (section 11.1 de l'approche expérimentale). En modifiant génétiquement les 400 premiers nucléotides pour qu'ils puissent présenter les codons les plus susceptibles d'être reconnus par la levure, tout en diminuant le pourcentage des bases A et T, nous voulions résoudre les problèmes d'expression dans *Pichia pastoris* et obtenir une production de capsides recombinantes dans ce système.

Les expériences sur le gène VP2 synthétique ont été entreprises de la même façon que pour le gène VP2 intact. Le fragment synthétique de 400 pb, obtenu par PCR, a bien été remplacé dans la séquence de la VP2 intacte pour produire le gène VP2 synthétique. Le séquençage a démontré que le cadre de lecture était respecté et que tous les nucléotides modifiés étaient présents. Des clones recombinants de levures ont été choisis pour l'expression. L'expression a été réalisée comme précédemment, toujours en utilisant les mêmes contrôles. Après analyse protéique sur gel de polyacrylamide, aucune bande correspondant à la protéine VP2 n'a pu être décelée contrairement au contrôle de β -galactosidase. Les expériences plus sensibles d'immunobuvardage de type Western ont été effectuées dans le but de vérifier la présence de la protéine VP2. Les résultats obtenus avec cette méthode se sont avérés négatifs, signifiant que la quantité de protéines produites était trop faible (ou inexistante) pour être détectée. Ces résultats insatisfaisants posaient plusieurs problèmes: premièrement, il fallait s'en remettre à un autre système d'expression pour produire des capsides recombinantes et deuxièmement, il fallait déterminer pourquoi les modifications apportées au gène VP2 n'ont pu réussir à établir l'expression de la protéine dans la levure *Pichia pastoris*.

Au niveau pratique, des expériences complémentaires pourraient être réalisées afin de tenter d'élucider la(les) cause(s) des problèmes d'expression de la protéine VP2 dans la levure *Pichia pastoris*. Pour une analyse complémentaire au RT-PCR, il faudrait évaluer la

transcription par un immunobuvardage de type Northern afin d'analyser la complexité des transcrits de la VP2 produits. Dans le même ordre d'idées, la cassette d'expression pourrait être testée *in vitro* en isolant les ARNm de levures recombinantes. Finalement, l'immunofluorescence indirecte sur des levures recombinantes pourrait être réalisée afin de vérifier, à l'aide d'un anticorps monoclonal dirigé contre la VP2, si au moins une proportion des levures recombinantes expriment la VP2. Les résultats de ces expériences pourraient répondre à de nombreuses questions, mais ne peuvent pas régler le problème d'expression dans la levure. Un des objectifs premiers de ce projet étant d'obtenir des capsides recombinantes, les expériences mentionnées ci-haut, quoiqu'étant fort intéressantes, n'étaient pas une priorité.

Au niveau théorique, plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les problèmes d'expression de la protéine VP2 dans la levure *Pichia pastoris*. Il est inconcevable d'énumérer toutes les causes possibles pouvant être mises en jeu. L'exposition des raisons les plus probables semble plus réaliste. Tout d'abord, quelques séquences consensus pouvant promouvoir une terminaison prématurée des transcrits chez *P. pastoris*, comme les séquences TTTTATA et ATTATTTTAT, ont été changées dans l'ADN de la gp120 (HIV-1) destinés à l'expression et les problèmes de transcription furent surmontés (Scorer *et al.*, 1993). De telles séquences ne sont pas présentes dans le cadre de lecture de la VP2, à l'exception d'une séquence très similaire: TTTTATC qui est située entre les nt 3397 et 3404, dans le cadre de lecture de la VP2 (numérotation des nucléotides du PPV). D'ailleurs, le pourcentage des bases A et T à proximité de cette région est élevé et peut occasionner des troubles de transcription. Certes, le pourcentage en bases A et T à l'extérieur du fragment synthétique demeure élevé tout comme les codons peu ou pas reconnus comme par exemple ATA (Ile), qui est présent près de 12 fois. Ces deux facteurs pourraient également contribuer à l'absence d'expression.

Pour tenter d'obtenir l'expression de la protéine VP2 dans la levure, deux solutions ont été envisagées. La première était d'obtenir des multi-insertions de la cassette d'expression dans le génome d'une même levure. L'effet du nombre de copies d'un gène sur l'expression est imprévisible. Dans certains cas, une seule copie est suffisante, tandis que dans d'autres, l'expression se voit grandement améliorée avec plus de 2 copies. Quelques fois même, une augmentation du nombre de copies a un effet nuisible sur l'expression (Thill *et al.*, 1990). Considérant très modestement les chances d'obtenir des clones multi-copies et l'effet de ces derniers sur l'expression, il a été jugé préférable de ne pas entreprendre cette voie sinueuse. La seconde alternative était de synthétiser le gène VP2 au complet, c'est-à-dire: incorporer les codons les plus utilisés par la levure, tout en réduisant le pourcentage des bases A et T. Cette approche, ne garantissant aucunement le succès, était lourde et très onéreuse et c'est pourquoi elle n'a pas été retenue non plus. L'utilisation du système d'expression du baculovirus dans lequel plusieurs VLPs de parvovirus différents ont été produites (section 4.2 de la revue bibliographique) était la solution la plus envisageable et c'est elle qui a été préconisée.

SYSTÈME D'EXPRESSION DU BACULOVIRUS

La production de capsides recombinantes du PPV dans le système du baculovirus a bien été caractérisée par le groupe de Casal (Martinez *et al.*, 1992). Les résultats obtenus ont pu être reproduits dans notre laboratoire par le docteur Zoltán Zádori, en utilisant des stratégies différentes de clonage et d'expression. Les capsides produites dans ce système ont été visualisées en microscopie électronique et testées par un anticorps monoclonal dirigé contre le PPV (3C9-D11-H11) pour réaliser qu'elles étaient structurellement et antigéniquement identiques aux capsides natives du PPV. Ces résultats étaient en accord avec ceux obtenus par le groupe de Casal et ses collaborateurs. L'utilisation des codons et la machinerie cellulaire des insectes font en sorte que le système d'expression du baculovirus semble, malgré des taux d'expression modestes et des coûts de production élevés, le système d'expression de choix pour la production du PPV recombinant et pour les autres parvovirus.

Les capsides obtenues ont été acheminées à l'université de Purdue où l'équipe du docteur Rossmann effectue présentement l'étude cristallographique de la particule. Ces particules ont aussi été utilisées dans les expériences d'affichage du bactériophage.

SÉLECTION DES PHAGOTOPES DES CAPSIDES RECOMBINANTES PPV À L'AIDE DE LIBRAIRIES PEPTIDIQUES

Dans cette étude, cinq librairies différentes ont été utilisées afin de sélectionner un total de 33 séquences peptidiques reconnaissant la capside recombinante du PPV. De toutes les librairies à l'étude, la librairie Ph.D.-12™ utilisée de concert avec des plateaux de culture de 60 mm, est celle qui a permis l'isolement des clones de plus grande affinité, tel que démontré par un test ELISA. L'absence de clones positifs pour les librairies Ph.D.-7™, pVIII 9aa, pVIII 9aa cys et FliTrx pourrait dépendre d'un répertoire peptidique trop restreint ou incomplet des librairies ou d'une présence trop importante de phages non spécifiques dominants tel que souligné dans la section 7.1 des résultats. La présence de nombreux résidus aromatiques dans les séquences peptidiques isolées à partir de plateaux de 96 puits traduit probablement l'isolement de clones qui se lient au plastique (Adey *et al.*, 1995). Il est également possible que les peptides présentés par les librairies de 7 et 9-mer ne soient pas suffisamment longs pour mimer adéquatement le paratope reconnaissant un épitope discontinu de la capside. De plus, les clones isolés à l'aide de ces librairies réagissaient très faiblement au test ELISA suggérant une faible affinité de ces peptides pour leur détection. La faible affinité des clones sélectionnés pour les librairies pVIII 9aa et pVIII 9aa cys serait une conséquence d'interactions multivalentes entre les phages recombinants et la capside, car ces librairies sont de type pVIII (elles présentent jusqu'à 2700 copies du même peptide en surface). Superficiellement, l'absence d'un motif commun pourrait suggérer que les peptides sélectionnés sont polyréactifs ou qu'ils peuvent se lier à un site de la capside du PPV qui est polyréactif envers un certain nombre de séquences peptidiques différentes. Des exemples de séquences peptidiques qui se lient à une molécule-cible, mais qui ont des séquences variables, ont déjà été rapportés (Winter, 1996). En définitive, une interaction

positive dépendrait aussi de la biologie du phage et de la capsid (Wilson et Finlay, 1998).

Suite à l'analyse de clones de grande affinité envers la capsid, 43 % de ceux-ci présentent la même séquence peptidique ATNYRSQMPLLT. Aucune autre séquence consensus n'est observée pour les autres peptides sélectionnés, à l'exception des clones 12.3 et 12.4 qui démontrent un consensus IHXXS, où X représente les a.a. P, Q, ou S. Étant donné la forte positivité des clones 12.1, 12.2, 12.3, 12.4, on pourrait affirmer que ces séquences, différentes les unes des autres, s'attacheraient avec une grande affinité à divers endroits de la capsid. Des études *in vitro* dans des systèmes cellulaires pourraient nous permettre de constater si ces séquences isolées s'apparentent à une molécule d'un récepteur de surface ou interne. Une inhibition par compétition avec ces peptides pourrait bloquer certaines fonctions virales du PPV. Le duo Ferrer et Harrison a démontré qu'un peptide sélectionné à l'aide d'affichage du bactériophage pouvait empêcher le lien entre la glycoprotéine de l'enveloppe gp120 du virus d'immunodéficience acquise de type I (HIV I) et la molécule réceptrice CD4 (Ferrer et Harrison, 1999). De tels peptides pourraient éventuellement mener au développement d'inhibiteurs viraux. Les travaux de Hong et Boulanger ont également démontré que des séquences peptidiques issues de sélection par affichage du bactériophage pouvaient diminuer l'adsorption de l'adénovirus humain de type 2 de 20 à 25 %, par compétition (Hong et Boulanger, 1995).

MUTANTS ÉCHAPPATOIRES DU PPV

La présente étude a été réalisée dans l'optique d'en connaître plus sur la structure antigénique du PPV car aucune information sur la localisation d'épitopes neutralisants sur le virion du PPV n'a véritablement été compilée. Le groupe de Kamstrup s'y était intéressé mais aucune conclusion irrécusable ne pouvait être émise pour ces travaux (Kamstrup *et al.*, 1998). Après l'obtention de mutants échappatoires, il a été décidé d'étudier la cartographie d'un épitope neutralisant de la capsid. L'utilisation de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 lors de la culture virale en cellules PT a permis, par pression sélective, de sélectionner

des mutants viraux pouvant se répliquer en présence de l'anticorps neutralisant. Suite à des passages répétés de la souche NADL-2 en présence de l'anticorps, les mutants étaient sélectionnés en test d'immunofluorescence indirecte (IFA). Les mutants ont été détectés lorsque la révélation par le 3C9-D11-H11 était négative mais que toutefois, elle était positive à la révélation par les anticorps polyclonaux porcins. À la cinquième ronde de sélection, des mutants exempts de virus sauvage ont été obtenus tel que démontré dans le tableau 12 des résultats.

L'utilisation d'un PCR quantitatif-compétitif (Qc-PCR) a permis de quantifier le pouvoir neutralisant de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 sur le virus sauvage et sur le mutant tout en permettant de déterminer exactement la quantité de génomes équivalents à utiliser pour les passages subséquents en cellules PT afin d'isoler un lot de mutants échappatoires le plus uniforme possible. Le génome de quelques mutants échappatoires isolés a été amplifié dans la région correspondant à la partie N-terminale de la protéine VP1 jusqu'à environ la moitié du génome codant pour cette protéine. Cette région est reconnue et bien documentée comme étant une région ciblée par les anticorps. Le séquençage de cette région a permis de déceler une mutation d'une asparagine par une lysine en amont de la séquence poly-glycines très conservée chez les différents parvovirus. La mutation (N→K) se situe au nucléotide 2875 du génome du PPV. L'épitope pourrait donc être situé dans cette région. Ce résultat coïncide avec les résultats obtenus pour le CPV. En effet, le groupe de Cortes et ses collaborateurs a démontré qu'un anticorps neutralisant du CPV reconnaissait un épitope dans la portion N-terminale de la protéine VP2 située immédiatement devant le domaine poly-glycines (Cortes *et al.*, 1993). D'ailleurs, d'autres résultats semblables sur le CPV ont déjà fait l'objet de publications (Lopez de Turiso *et al.*, 1991; Langeveld *et al.*, 1993). La partie N-terminale serait à peine exposée en surface du virion du CPV, mais deviendrait accessible suite à des changements stériques du virion comme lors de l'attachement au récepteur cellulaire (Cortes *et al.*, 1993). Par analogie au mécanisme de neutralisation du CPV par un anticorps dirigé contre la position N-terminale, l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 pourrait exercer son pouvoir neutralisant en interagissant dans

le procédé de décapsidation du virus après l'attachement cellulaire. L'analyse de plusieurs mutants permettra d'en conclure davantage et la résolution de la structure tri-dimensionnelle du PPV, présentement en cours, permettra de mieux caractériser les régions de prédominance antigénique de ce virus.

CONCLUSION

Étant donné l'information importante que la structure et les déterminants de surface du PPV peut donner sur les mécanismes d'infection de ce virus, il a semblé intéressant d'établir un système d'expression de particules recombinantes du PPV par l'entremise desquelles la structure et les déterminants de surface peuvent être étudiés.

Des systèmes d'expression mis à l'étude, le système du baculovirus semble être le plus favorable quant à la production de capsides recombinantes du PPV. Les efforts ont été vains quant à la tentative d'obtenir ces particules dans la levure *Pichia pastoris*. Le blocage serait situer au niveau de la traduction, étant donné que les transcrits de VP2 ont pu être identifiés. La manipulation génétique partielle du gène VP2 n'a pas permis d'obtenir l'expression de la protéine structurale dans la levure. Il serait audacieux, mais intéressant, de remodeler le gène VP2 au complet, afin qu'il puisse présenter les codons les plus utilisés par *Pichia pastoris*, dans le but de vérifier l'expression de la VP2 dans cet organisme. Toutefois, le système d'expression du baculovirus a permis d'obtenir les capsides recombinantes nécessaires à l'étude des autres volets de ce projet de recherche. L'étude structurale, réalisée sur ces particules par l'équipe du docteur Rossmann, permettra d'élucider plusieurs stratégies virales utilisées par ce virus et conduira vers le développement de vaccins plus efficaces.

Des bibliothèques peptidiques ont permis de sélectionner des peptides de grande affinité envers la capside recombinante du PPV. La diversité des séquences isolées laisse présager que plusieurs régions de la capside peuvent être impliquées dans l'interaction avec une molécule de l'hôte. L'infection virale en présence des différents peptides pourra être effectuée afin de déterminer à quel niveau ces peptides pourraient entrer en compétition avec les ligands naturels de la capside virale. De plus, les peptides pouvant bloquer certaines fonctions virales peuvent être cartographiés sur la capside en criblant des bibliothèques peptidiques afin d'identifier des peptides de grande affinité envers le peptide inhibiteur de fonctions.

La cartographie d'un paratope reconnu par l'anticorps 3C9-D11-H11 avait pour but de vérifier dans quelle région des protéines de structure la neutralisation virale avait lieu, afin de déterminer le rôle de cette dernière dans l'infection. L'obtention de clones viraux pouvant se répliquer en présence de l'anticorps neutralisant nous a permis de débiter le séquençage de la région des protéines structurales susceptible d'être reconnue par l'anticorps. La présence d'une mutation dans un seul des clones séquencés a permis de constater le changement d'un a.a. asparagine à l'a.a. lysine. L'analyse de plusieurs clones différents permettra de conclure si ce changement est constant et s'il est important dans la reconnaissance de l'anticorps. Néanmoins, ce changement (N->K) en position N-terminale de la protéine VP2 est intéressant car cette région est reconnue par des anticorps neutralisants pour d'autres parvovirus autonomes similaires au PPV.

En définitive, ces travaux ont ouvert la voie vers d'autres expériences qui pourront être réalisées à court terme afin de mieux connaître l'interaction du PPV avec son environnement.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voue ma gratitude envers le professeur Peter Tijssen pour son accueil et pour la confiance prodiguée lors de mon arrivée dans son laboratoire de recherche. L'adaptation a été aussi facile qu'agréable.

Je tiens à remercier le groupe scientifique du laboratoire ainsi que toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu des discussions savantes tout au long de ces travaux.

Du laboratoire du docteur Tijssen, je remercie plus particulièrement Marie-Claude, Micheline, Zoltán, sans oublier ce cher Benoît. Toutes ces personnes m'ont appris à aimer la recherche et à surmonter tous les défis qu'elle pouvait représenter.

Un gros merci à Louise et Lise, les grandes dames du séquençage, pour l'excellent travail dans des délais parfois très courts.

On ne réalise pas des travaux de maîtrise sans l'appui moral d'une famille, aussi petite puisse-t-elle être: Diane, Carole, Claude, Marie, Juliette, ce mémoire est aussi le vôtre.

Je m'en voudrais d'oublier Amira, Simon, les filles de l'AGEIAF, Barbara et les autres qui ont contribué à des souvenirs inoubliables...

Merci aussi à la Fondation Armand-Frappier et à l'Institut Armand-Frappier pour m'avoir permis d'apprendre, d'aimer et surtout d'expérimenter la vie scientifique dans un environnement de qualité.

BIBLIOGRAPHIE

Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A.L., Wang, F., Tattersall, P., Rossmann, M.G. 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* **6**(11): 1369-1381.

Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M.G., Strassheim, M.L., Parrish, C.R. 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particules. *Proteins* **16**(2): 155-171.

Altmeyer, R., Murdin, A.D., Harber, J.J., Wimmer, E. 1991. Construction and characterization of a poliovirus/rhinovirus antigenic hybrid. *Virology* **184**(2): 636-644.

Atchison, R.W., Casto, B.C., McD. Hammon, W. 1965. Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* **149**: 754-756.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. 1994. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Ball-Goodrich, L. J., Tattersall, P. 1992. Two amino acids substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J Virol* **66**(6): 3415-3423.

Basak, S., Turner, H. 1992. Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology* **186**(2): 368-376.

Basak, S., Turner, H., Parr, S. 1994. Identification of a 40 to 42kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells. *Virology* **205**(1): 7-16.

Bergeron, J., Hébert, B., Tijssen, P. 1996. Genomic organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* **70**(4): 2508-2515.

Bergeron, J., Menezes, J., Tijssen, P. 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* **197**: 86-98.

Brown, K.E., Anderson, S. M., Young, N.S. 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**: 114-117.

Brown, K.E., Young, N.S. 1997. Parvovirus B19 in human disease. *Annu Rev Med* **48**: 59-67.

Chang, S.-F., Sgro, J.-Y., Parrish, C. R. 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol* **66**(12): 6858-6867.

Chapman, M. S., Rossmann, M. G. 1993. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**: 491-508.

Christensen, J., Alexsandersen, S., Bloch, B., Aasted, B., Uhental, Å. 1994. Production of mink enteritis virus empty capsids by expression in a baculovirus vector system, a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink. *J Gen Virol* **75**: 149-155.

Clare, J. J., Romanos, M. A., Rayment, F. B., Rowedder, J. E., Smith, M. A., Payne, M. M., Sreekrishna, K., Henwood, C. A. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* **105**: 205-212.

Clarke, B.E., Brown, A.L., Grace, K.G., Hastings, G.Z., Brown, F., Rowlands, D.J., Francis M.J. 1990. Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particles produced in bacteria. *J Gen Virol* **71**(Pt 5): 1109-1117.

Clemens, D.L., Wolfenbarger, J.B., Mori, S., Berry, B.D., Hayes, S.F., Bloom, M.E. 1992. Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins by a recombinant vaccinia virus: self-assembly of capsid proteins into particles. *J Virol* **66**(5): 3077-3085.

Corsini, J., Afanasiev, B., Maxwell, I.H., Carlson, J.O. 1996. Autonomous parvovirus and densovirus gene vectors. *Adv Virus Res* **47**: 303-351.

Cortes, E., San Martin, C., Langeveld, J., Meloen, R., Dalsgaard, K., Vela, C., Casal, I. 1993. Topographical analysis of canine parvovirus virions and recombinant VP2 capsids. *J Gen Virol* **74**: 2005-2010.

Cortese, R., Monaci, P., Nicosia, A., Luzzago, A., Felici, F., Galfre, G., Pessi, A., Tramontano, A., Sollazzo, M. 1995. Identification of biologically active peptides using random libraries displayed on phage. *Curr Opin Struct Biol* **6**: 73-80.

Cortis, E., San Martin, C., Langeveld, J., Meloen, R., Dalsgaard, K., Vela, C., Casal, J. I. 1993. Topographical analysis of canine parvovirus virions and recombinant VP2 capsids. *J Gen Virol* **74**: 2005-2010.

Cotmore, S.F., D'Abramo, A.M., Ticknor C.M., Tattersall, P. 1999. Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP-1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* **254**: 169-181.

Cotmore, S.F., Tattersall, P. 1987. The autonomously replicating parvovirus of vertebrates. *Adv Virus Res* **33**: 91-174.

Cotmore, S.F., Tattersall, P. 1995. DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars Virol* **6**(5): 271-281.

Cwirla, S.E., Balasubramanian, P., Duffin, D.J., Wagstrom, C.R., Gates, C.M., Singer, S.C., Davis, A.M., Tansik, R.L., Mattheakis, L.C., Boytos, C.M., Schatz, P.J., Baccanari, D.P., Wrighton, N.C., Barrett, R.W., Dower, W.J. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural cytokine. 1997. *Science* **276**(5319): 1696-1699.

Dea, S., Elazhary, M.A.S.Y., Martineau, J.P., Vaillancourt, J. 1985. Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Can J Comp Med* **49**: 343-345.

Dente, L., Vetriani, C., Zucconi, A., Pelicci, G., Lanfranccone, L., Pelicci, P.G., Cesareni, G. 1997. Modified phage peptide libraries as a tool to study specificity of phosphorylation and recognition of tyrosine containing peptides. *J Mol Biol* **269**(5): 694-703.

Devlin, J.J., Panganihiban, L.C., Devlin, P.E. 1990. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science* **249**: 404-406.

Ferrer, M., Harrison, S.C. 1999. Peptide ligands to immunodeficiency virus type1 gp120 identified from phage display libraries. *J Virol* **73**(7): 5795-5802.

French, T.J., Roy, P. 1990. Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J Virol* **64**(4): 1530-1536.

Gardiner, E. M., Tattersall, P. 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **62**(8): 2605-2613.

Harding, M. J., Molitor, T. W. 1992. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Arch Virol* **123**: 323-333.

Henikoff, S., Cohen, E.H. 1984. Sequences responsible for transcription termination on a gene segment in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cel Biol* **4**: 1515-1520.

Hofmann, K.J., Cook, J.C., Joyce, J.G., Brown, D.R., Schultz, L.D., George, H.A., Rosolowsky, M., Fife, K.H., Jansen, K.U. 1995. Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Virology* **209**(2): 506-518.

Hong, S.S., Boulanger, P. 1995. Protein ligands of the human adenovirus type 2 outer capsid identified by biopanning of a phage-displayed peptide library on separate domains of wild-type and mutant penton capsomers. *EMBO J* **14**(19): 4714-4727.

Hruby, D.E. 1990. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin Microbiol Rev* **3**(2): 153-170.

Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.

Irninger, S., Egli, C.M., Braus, G.H. 1991. Different classes of polyadenylation sites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cel Biol* **11**: 3060-3069.

Jacoby, R.O., Ball-Goodrich, L.J., Besselsen, B.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., Smith, A.L. 1996. Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* **46** (4): 370-380.

Joo, H.S., Donaldson-Wood, C.R., Johnson, R.H. 1976. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. *Arch Virol* **51**: 123-129.

Kajigaya, S., Fujii, H., Field, A., Anderson, S., Rosenfeld, S., Anderson, L.J., Shimada, T., Young, N.S. 1991. Self-assembled parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4646-4650.

Kajigaya, S., Shimada, T., Fujita, S., Young, N.S. 1989. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**(19): 7601-1605.

Kamstrup, S., Langeveld, J., Botner, A., Nielsen, J., Schaaper, W.M.M., Boshuizen, R.S., Casal, J.I., Hojrup, P., Vela, C., Meloen, R., Dalsgaard, K. 1998. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. *Virus Res* **53**: 163-173.

Katz, B.A. 1995. Binding to protein targets of peptidic leads discovered by phage display: crystal structures of streptavidin-bound linear and cyclic peptide ligands containing the HPQ sequence. *Biochemistry* **34**(47): 15421-15429.

Katz, J.B., Van Deusen, R.A. 1985. Radioimmunoassay of adjuvant-associated porcine parvovirus using a monoclonal antibody in a nitrocellulose membrane system. *J Virol Met* **12**: 193-198.

Kresse, J.I., Taylor, W.D., Stewart, W.W., Eernisse, K.A. 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Veterinary Microbiology* **10**(6): 525-531.

Kurstak, E., Tijssen, P. 1981. Animal parvoviruses: Comparative aspects and diagnosis. dans *Comparative Diagnosis of Viral Diseases*. Vol.III. pp. 3-65, Academic Press.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Lager, K. M., Mengeling, W. L., Liu, W. 1992. Comparison of the virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. *J Vet Diag Invest* **4**: 245-248.

Langeveld, J.P.M., Casal, J.I., Vela, C., Dalsgaard, K., Smale, S.H., Puijk, W.C., Meloen, R.H. 1993. B-cell epitopes of canine parvoviruses: Distribution on the primary structure and exposure on the surface. *J Virol* **67**: 765-772.

Le Gall-Recule, G., Jestin, V., Chagnaud, P., Blanchard, P., Jestin, A. 1996. Expression of muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins. *J Gen Virol* **77**(Pt 9): 2159-63.

LeGouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M., Stankova, J. 1994. Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal Biochem* **219**(1): 164.

Lenghaus, C., Forman, A.J., Hale, C.J. 1978. Experimental infection of 35, 50, and 60 day old fetuses with porcine parvovirus. *Aust Vet J* **54**: 418-422.

- Li, Y., Jousset, F.-X., Giraud, C., Rolling, F., Quiot, J.-M., Bergoin, M. 1996. A titration procedure of the *Jononia coenia* densovirus and quantitation of transfection by its cloned genomic DNA in four lepidopteran cell lines. *J Virol Met* **57**: 47-60.
- Linser, P., Bruning, H., Armentrout, R.W. 1977. Specific binding site for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J Virol* **24**: 211-221.
- Llamas-Saiz, A. L., Agbandje-McKenna M., Parker, J. S. L., Wahid, A. T. M., Parrish C. R., Rossmann, M. G. 1996. Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range. *Virology* **225**: 65-71.
- Lo-Man, R., Rueda, P., Sedlik, C., Deriaud, E., Casal, I., Leclerc, C. 1998. A recombinant virus-like particle system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. *Eur J Immunol* **28**(4): 1401-1407.
- Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Martinez, C., Ruiz de Ybanez, R., Simmaro, I., Vela, C., Casal J.I. 1992. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol* **66**(5): 2748-2753.
- Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Ranz, AA., Garcia, J., Sanz, A., Vela, C., Casal, J.I. 1991. Fine mapping of canine parvovirus B cell epitopes. *J Gen Virol* **72**: 2445-2456.
- Luckow, V., Summers, M.D. 1988. Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Bio/technology* **6**: 47-55.
- Martinez, C., Dalsgaard, K., Lopez de Turiso, J.A., Cortes, E., Vela, C., Casal, J.I. 1992. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine* **10**(10): 684-90.
- Mengeling, W.L., Cutlip, R.C. 1976. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **37**: 1393-1400.
- Miyamura, K., Kajigaya, S., Momoeda, M., Smith-Gill, S.J., Young, N.S. 1994. Parvovirus particles as platforms for protein presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**(18): 8507-8511.
- Molitor, T. W., Joo, H. S. 1990. Clinical and pathological features of porcine-parvovirus-related disease and its diagnosis. Dans *Handbook of parvoviruses*, vol. II (Tijssen P., ed.) pp 135-150. CRC Press, Boca Raton, FL.

Morinet, F., D'Auriol, L., Tratschin, J.D., Galibert, F. 1989. Expression of the human parvovirus B19 protein fused to protein A in *Escherichia coli*: recognition by IgM and IgG antibodies in human sera. *J Gen Virol* **70** (Pt 11): 3091-3097.

Moss, B. 1991. Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science* **252**(5013): 1662-1667.

Naides, S.J. 1998. Rheumatic manifestations of parvovirus B19 infection. *Dans rheumatic disease clinics of North America* **24**(2): 375-401.

Oraveerakul, K., Choi, C. S., Molitor, T. W. 1993. Tissue tropism of porcine parvovirus in swine. *Arch Virol* **130**: 377-389.

Parmley, S. F., Smith, G. P. 1988. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* **73**: 305-318.

Parrish C. R. 1991. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* **183**: 195-205.

Parrish, C. R., Carmichael, L. E. 1983. Antigenic structure and variation of canine parvovirus type-2, feline panleukopenia virus, and mink enteritis virus. *Virology* **129**: 401-414.

Parrish, C. R., Carmichael, L. E. 1986. Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus. *Virology* **148**: 121.

Parrish, C. R., O'Connell, P.H., Evermann, J.F., Carmichael, L.E. 1985. Natural variation of canine parvovirus. *Science* **230**: 1046-1048.

Phizicky, Fields, 1995. Protein-protein interactions. *Microbiol. Rev.* **59**: 103-105.

Rayment, F.B., Crosdale, E., Morris, D.J., Pattison, J.R., Talbot, P., Clare, J.J. 1990. The production of human parvovirus capsid proteins in *Escherichia coli* and their potential as diagnostic antigens. *J Gen Virol* **71**(Pt 11): 2665-2672.

Redmond, M.J., Ijaz, M.K., Parker, M.D., Sabara, M.I., Dent, D., Gibbons, E., Babiuk, L.A. 1993. Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine* **11**(2): 273-281.

- Rimmelzwaan, G.F., Carlson, J., Uydeltaag, F.G.C.M., Osterhaus, A.D.M.E. 1990. A synthetic peptide derived from the amino acid sequence of canine parvovirus structural proteins which defines a B cell epitope and elicits antiviral antibody in BALB c mice. *J Gen Virol* **71**: 2741-2745.
- Romanos, M. A., Scorer, C.A., Clare, J. J. 1992. Foreign gene expression in yeast: A review. *Yeast* **8**: 423-488.
- Rossmann, M.G., Palmenberg, A. C. 1988. Conservation of the putative receptor attachment site in picornaviruses. *Virology* **164**:373-382.
- Saliki, J. T., Mizak, B., Flore, H., P., Gettig, R. R., Burand, J. P., Carmichael, L. E., Wood, H. A., Parrish, C. R. 1992. Canine parvovirus empty capsids produced by the expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J Gen Virol* **73**: 369-374.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, Second edition. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sasagawa, T., Pushko, P., Steers, G., Gschmeissner, S.E., Hajibagheri, M.A., Finch, J., Crawford, L., Tommasino, M. 1995. Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Virology* **206**(1): 126-35.
- Sasnauskas, K., Buzaitė, O., Vogel, F., Jandrig, B., Razanskas, R., Staniulis, J., Scherneck, S., Kruger D.H., Ulrich, R. 1999. Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem* **380**(3): 381-386.
- Scorer, C. A., Buckholz, R. G., Clare, J. J., Romanos, M. A. 1993. The intracellular production and secretion of HIV-1 envelope protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **136**: 111-119.
- Sedlik, C., Dridi, A., Deriaud, E., Saron, M.F., Rueda, P., Sarraseca, J., Casal, J.I., Leclerc C. 1999. Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *J Virol* **73**(4): 2739-2744.
- Sedlik, C., Saron, M., Sarraseca, J., Casal, I., Leclerc, C. 1997. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(14): 7503-7508.

Siegl, G. 1990. Variability, adaptability, and epidemiology of autonomous parvoviruses. dans Handbook of parvoviruses. Vol.II. Tijssen, P. Ed. pp. 59-74, CRC Press.

Siegl, G., Bates, R.C., Berns, K.I., Carter, B.J., Kelly, D.C., Kurstak, E., Tattersall, P. 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. Intervirology **23**: 61-73.

Simpson, A.A., Chipman, P.R., Baker, T.S., Tijssen, P., Rossmann, M.G. 1998. The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. Structure **6**: 1355-1367.

Smith, G. P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science **228**: 1315-1317.

Spalholz, B.A., Tattersall, P. 1983. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. J Virol **46**: 937-943.

Sreekrishna, K. 1993. Strategies for optimizing protein expression and secretion in the methylotrophic yeast *P. pastoris*. Dans Industrial Microorganisms: Basic and applied molecular genetics, Ed. R.H. Baltz, G.D. Hegeman, P.L. Skatrud, American Society of Microbiology, Washington DC 2005.

Sreekrishna, K., Kropp, K.E. 1996. *Pichia pastoris* Dans Non conventional yeasts in Biotechnology, Ed. K. Wolf, Springer, pp 203-253.

Stemmer, P. C. W., Cramer, A., Ha, K. D., Brennan, T. M., Heyneker, H. L. 1995. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. Gene **164**: 49-53.

Strassheim, M. L., Gruenberg, A., Veijalainen, P., Sgro, J.-Y., Parrish, C. R. 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. Virology **198**: 175-184.

Studdert, M.J. 1990. Tissue tropism of parvoviruses. dans Handbook of parvoviruses. Vol.II. Tijssen, P. Ed. pp. 3-27, CRC Press.

Summerford, C., Samulski, R.J. 1998. Membrane-associated Heparan sulfate proteoglycan is a receptor for Adeno-Associated Virus type 2 virions. J Virol **72**(2): 1438-1445.

Tartaglia, J., Pincus, S., Paoletti, E. 1990. Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Crit Rev Immunol* **10**(1): 13-30.

Tattersall, P., Ward, D.C. 1976. Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**: 106-109.

Thill, G.P., Davis, G.R., Stillman, G.R., Holtz, C., Brierly, R., Engel, M., Bucholz, R., Kinney, J., Provo, S., Vedvick, T., Siegel, R.S. 1990. Positive and negative effects of multi-copy integrated expression vectors on protein expression in *Pichia pastoris*. Dans: Proc 6th Int Symp on Genetic of Industrial Microorganisms, Strasbourg, pp 477-490.

Tijssen, P. 1999. Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta Vet Hung* **47**(3): 379-394.

Tijssen, P., Bergeron, J. 1994. Parvoviruses: rodents, pigs, cattle and geese. Dans *Encyclopedia of Virology* pp 1067-1075. Academic Press, San Diego, CA.

Tosser, G., Labbe, M., Bremont, M., Cohen, J. 1992. Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J Virol* **66**(10): 5825-5831.

Truyen, U., Parrish, C.R. 1995. The evolution and control of parvovirus host ranges. *Seminars Virol* **6**(5): 311-317.

Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T.J., Rossmann, M.G., Compans, R.W., Parrish, C.R. 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**(5000): 1456-1464.

Urakawa, T., Ferguson, M., Minor, P.D., Cooper, J., Sullivan, M., Almond, J.W., Bishop, D.H. 1989. Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector. *J Gen Virol* **70** (Pt 6): 1453-63.

Vella, C., Minor, P.D., Weller, I.V., Jenkins, O., Evans, D., Almond, J. 1991. Recognition of poliovirus/HIV chimeras by antisera from individuals with HIV infection. *AIDS* **5**(4): 425-430.

Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., Vuento, M. 1998. Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* **72**(1): 802-806.

Wilson, D. R., Finlay, B. B. 1998. Phage display: applications, innovations, and issues in phage and host biology. *Can J Microbiol* **44**: 313-329.

Winter, J. 1996. Bacteriophage display libraries. Dans Cleland, J.L., Craik, C.S. (Eds). *Protein Engineering. Principles and Practice*. Wiley-Liss, New-York, pp 349-367.

Wrighton, N.C., Farrell, F.X., Chang, R., Kashyap, A.K., Barbone, F.P., Mulcahy, L.S., Johnson, D.L., Barrett, R.W., Jolliffe, L.K., Dower, W.J. 1996. Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science* **273**(5274): 458-464.

Wu, H., Rossmann, M.G. 1993. The canine parvovirus empty capsid structure. *J Mol Biol* **233**(2): 231-244.

Xie, Q., Chapman, M.S. 1996. Canine parvovirus capsid structure, analyzed at 2.9 Å resolution. *J Mol Biol* **264**(3): 497-520.

Zaret, K.S., Sherman, F. 1984. Mutationnaly altered 3' ends of yeast *CYC1* mRNA affect transcript stability and translational efficiency. *J Mol Biol* **177**: 107-136.

COMMUNICATIONS:

1. B. Hébert, M. Laakel, Z. Zádori, **S. Gariépy**, M.-C. Lacoste and P.Tijssen. Relative importance of capsid residues associated with the *in vitro* tropism of porcine parvovirus during the initial steps of infection. VIIth International Parvovirus Workshop and Ist Euroconference on Health Benefits and Risks from Parvovirus Infection (1997).
2. Z. Zádori, P. Raymond, Y. Li, M.-C. Lacoste, **S. Gariépy** and P.Tijssen. Novel phospholipase A₂ activity in parvovirus capsids. Ist Parvovirus Euroconference (Event 2) Health Benefits and Risks from Parvovirus Infection (1999).
3. Z. Zádori, P. Raymond, Y. Li, M.-C. Lacoste, **S. Gariépy**, M. Allaire and P.Tijssen. Novel phospholipase A₂ activity of VP1 of parvoviruses. 11th International Congress of Virology (1999).