

*Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier*

**« Les effets des mutations ponctuelles dans les
régions conservées de la protéine de structure VP2
du Parvovirus Porcin pendant son cycle viral »**

Par
Eliane Akl

*Mémoire
présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en Virologie & Immunologie*

Dr. Peter Tijssen (directeur de recherche), INRS-IAF

Le 12 Janvier 2007

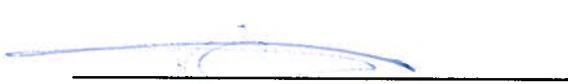
RÉSUMÉ

Le Parvovirus Porcin (PPV) est un virus très résistant et qui se transmet facilement. Il cause le syndrome SMEDI (Stillbirths, Mummified fetuses, Embryonic Death, Infertility), ce qui engendre des pertes économiques importantes aux industries porcines à travers le monde.

Le génome du PPV de 5 kb est formée d'ADN simple brin de polarité négative. La capsid virale non-enveloppée est de symétrie icosaédrale et est composée de 60 copies des protéines structurales, soit VP1 ou VP2. Cette dernière est la composante majeure de la capsid (80-90%) et elle contient des régions conservées par rapport aux autres parvovirus. Notre hypothèse propose que plusieurs régions conservées pourraient jouer un rôle critique dans l'assemblage et la translocation nucléaire de la VP2 et ceci serait nécessaire à la formation de la capsid virale.

Vingt-six mutations ponctuelles ont été introduites dans ces régions dans le clone infectieux. La réplication après transfection a été étudiée par immunofluorescence (IF) et microscopie confocale. Les phénotypes obtenus sont divisés en deux groupes selon leur capacité de former des capsides. Quatre mutants permettent la synthèse de la capsid (groupe C⁺) dont deux sont infectieux. Pour sa part, le groupe C⁻ comporte 22 mutants qui ne forment pas de capsid virale et est subdivisé en trois sous-groupes selon la répartition de la protéine VP2 dans la cellule. Dans le sous-groupe I, la VP2 se trouve majoritairement dans le cytoplasme; dans le sous-groupe II, la VP2 est transporté au noyau; et dans le sous-groupe III, la VP2 est répartie dans le cytoplasme et le noyau.

La localisation des acides aminés mutés dans la VP2 dans divers mutants et les phénotypes résultants suggèrent que les monomères doivent être oligomérisés en trimères pour leur translocation au noyau et puis assemblés en capsid vide avant l'incorporation de l'ADN virale.



Eliane Akl



Dr. Peter Tijssen, Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

En premier lieu, j'aimerais remercier mon directeur de recherche le Dr. Peter Tijssen, pour m'avoir permis de faire ma maîtrise au sein de son laboratoire. Merci pour votre supervision, l'analyse et figures des structures et surtout pour votre patience avec moi et avec ma vie pleine de circonstances.

Un gros merci aussi à Dr. Zoltán Zádori, l'associé de recherche du Dr. Tijssen, pour m'avoir supporté tout au long du projet et de m'avoir appris toutes les techniques requises pour ce projet.

Merci au Dr. József Szelei pour son expertise, ainsi que Mme Micheline Letarte, M.Sc., pour l'aide technique et le séquençage.

J'aimerais également remercier mes collègues du labo, Marie Eve Moreau, Mohamed El-Far, Sandra Fernandes et surtout Chahrazed Belabani.

J'aimerais aussi exprimer ma gratitude pour ma famille au complet. Tout particulièrement à ma mère, en gardant mon petit bébé, elle m'a permis d'achever mon projet. Merci maman pour tout ton aide.

J'aimerais dédier ce projet à une amie chère qui nous a quitté récemment. Néna, tu seras toujours présente dans nos souvenirs.

Et finalement, je remercie tout spécialement mon mari Charles et mon petit bébé Christian. Surtout merci à toi Charles pour m'avoir encouragé tout au long du projet. Ta patience, ton support et ton amour m'ont donné la force d'aller jusqu'au bout de ce projet. Je t'aime.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Résumé</i>	ii
<i>Remerciements</i>	iv
<i>Table des matières</i>	vi
<i>Liste des figures</i>	ix
<i>Liste des tableaux</i>	x
<i>Liste des abréviations</i>	xi
<i>Introduction</i>	1
<i>Revue de littérature</i>	4
1. Généralités du Parvovirus Porcin	5
1.1 Transmission et virémie	5
1.2 Souches et pathogénie	6
1.3 Taxonomie	7
1.4 Cellules cibles	8
1.5 Propriétés physiques	9
2. Aspects moléculaires	10
2.1 Arrangement génomique	10
2.2 Épissage alternatif	14
2.3 Protéines non-structurales	18
2.4 Protéines structurales	19
2.5 Cycle et réplication viraux	22
2.6 La capside virale	24
2.6.1 Structure secondaire	24
2.6.2 Les axes de symétrie	25
2.6.3 L'assemblage de la capside	25
2.6.4 Rigidité structurale des acides aminés	29
3. Les acides aminés conservés dans la VP2	29

<i>Méthodologie</i>	33
1. Les Gels.....	34
1.1 Gels d'agarose	34
1.2 Gels de polyacrylamide.....	34
1.2.1 Transfert sur une membrane de nitrocellulose	35
1.2.2 Immunobuvardage de type Western.....	36
2. Purification d'ADN	37
2.1 Mini-préparation rapide d'ADN (UFX).....	37
2.2 Purification d'ADN plasmidique	38
2.2.1 Purification par phénol / chloroforme	39
2.3 Séquençage.....	39
2.4 Midi-préparation d'ADN.....	41
3. Création des mutants	42
3.1 Les oligonucléotides des mutants.....	42
3.2 Mutagénèse dirigée	43
3.3 Transformation des bactéries	47
3.3.1 Cellules compétentes.....	47
3.4 Clonage dans le clone infectieux.....	48
4. Culture cellulaire	50
4.1 Passage des cellules.....	50
4.2 Transfection des cellules PT	51
4.3 Immunofluorescence et microscopie confocale	51
4.4 Les anticorps	52
5. Production virale des mutants formant des capsides.....	53
5.1 Purification virale.....	53
5.2 Détermination de l'infectivité des mutants formant des capsides.....	54
5.3 Titrage des mutants formant des capsides (C ⁺).....	54
5.4 Quantification des génomes viraux	55
5.5 Production des figures de protéines	55

<i>Résultats</i>	57
1. Les résidus conservés de VP2	58
2. Transfection des cellules PT et phénotypes des clones	63
3. Infectivité des mutants du groupe C ⁺	72
4. Quantification capsidique et génomique du groupe C ⁺	73
<i>Discussion</i>	77
1. Production des mutants	78
2. L'emplacement et l'effet des acides aminés du groupe C ⁺ sur la protéine	78
3. L'emplacement et l'effet des acides aminés du groupe C ⁺ sur la protéine	85
<i>Conclusion</i>	90
<i>Bibliographie</i>	93

Listes des Figures

Figure 1 : Le parvovirus porcin.....	12
Figure 2 : Épissage alternatif.....	16
Figure 3 : Les protéines structurales	21
Figure 4 : La symétrie de la capsid virale	27
Figure 5 : Flexibilité et localisation des acides aminés conservés de la VP2 dans la capsid.....	31
Figure 6 : Alignement de la VP2 de plusieurs parvovirus	59
Figure 7 : Les acides aminés conservés à travers les parvovirus	61
Figure 8 : Observation en microscopie et phénotype des cellules PT transfectées avec les témoins positifs PN2Δ et PN2ΔX lors des infections de 24 et 48 heures.....	64
Figure 9 : Phénotype des cellules PT transfectées par des mutants du groupe C ⁻ cytoplasmique	67
Figure 10 : Phénotype des cellules PT transfectées avec les mutants du groupe C ⁻ nucléaire.....	68
Figure 11 : Phénotype des cellules PT transfectées par le groupe C ⁻ cytoplasmique et nucléaire	79
Figure 12 : Phénotype des cellules PT transfectées par les mutants du groupe C ⁺	70
Figure 13 : PCR quantitatif MIMIC de la préparation I.....	75
Figure 14 : PCR quantitatif MIMIC de la préparation II	76
Figure 15 : La position des résidus mutés de la VP2 du groupe C ⁻ cytoplasmique dans un trimère	80
Figure 16 : La position des résidus mutés de la VP2 du groupe C ⁻ nucléaire dans un trimère	82
Figure 17 : Groupe C ⁻ cytoplasmique et nucléaire.....	84
Figure 18 : La position des résidus mutés de la VP2 du groupe C ⁺ dans un pentamère	86

Listes des Tableaux

Tableau I: Amorces utilisées pour le séquençage.....	40
Tableau II : L'énumération des résidus mutés effectués avec leurs amorces.....	45
Tableau III : Classification des mutations selon le phénotype de production de capside virale	66

Listes des Abréviations

Å: Ångstrom

AAV: Adeno-Associated Virus

ADN: Acide désoxyribonucléique

ATP: Adénosine triphosphate

B19: Parvovirus humain

CPV : Parvovirus Canin

Da: Dalton

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DO: Densité optique

FPV: Parvovirus Félin

HA: Hémagglutination

HAI: Inhibition d'hémagglutination

kb: Kilobase

kDa : KiloDalton

LB: Milieu de Luria-Bertani

MLN : Motif de localisation nucléaire

MVM: Virus Minute de la souris

NS: Protéine non-structurale

ORF: Cadre de lecture ouvert

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PLA₂ : Phospholipase A₂

PPV: Parvovirus Porcin

PT : Lignée cellulaire de testicules de porc

SLN : Signal de localisation nucléaire

SMEDI: Stillbirths, Mummified fetuses, Embryonic Death, Infertility

ST : Lignée cellulaire de testicules de porc

UV : Ultra-violet

VP : Protéine structurale

INTRODUCTION

Le Parvovirus Porcin (PPV) fut identifié comme l'agent causal du syndrome SMEDI dans les années soixante-dix. Le SMEDI est un syndrome de déficience reproductive dont l'acronyme signifie la mort à la naissance (Stillbirths), la momification fœtale (Mummified fetuses), la mort embryonnaire (Embryonic Death) et l'infertilité (Infertility).

Le PPV est retrouvé dans les élevages porcins à travers le monde et cause un impact économique et médical. L'omniprésence du PPV dans l'environnement engendrent des conséquences économiques liées à des pertes qui sont associées aux problèmes de reproduction et au coût de la vaccination dans l'industrie porcine. La vaccination est le seul moyen de lutter contre ce virus. Normalement, le risque d'infection par le PPV chez l'homme est négligeable. Toutefois, des produits biologiques d'origine porcine sont utilisés dans le secteur médical, ce qui peut conduire à l'augmentation du contact interspèce entre l'homme et le porc. Les parvovirus possèdent une grande facilité d'adaptation, tel que fut le cas du parvovirus félin (FPV) qui s'est adapté au vison et au chien. Cette caractéristique pourrait permettre au PPV de franchir la barrière d'espèce et de s'adapter à l'homme. Une meilleure compréhension des relations structures-fonctions du PPV pourrait permettre éventuellement d'élucider les mécanismes d'infection, ainsi que les déterminants du tropisme viral. Les connaissances acquises pourront alors être applicables dans l'élaboration de nouvelles stratégies pour combattre ce virus, tels que des agents anti-viraux.

La famille *Parvoviridae* est divisée en deux sous-familles, *Densovirinae* et *Parvovirinae*. Cette dernière comporte cinq genres dont le genre *Parvovirus*, qui regroupe des virus à réplication autonome infectant les vertébrés et auquel appartient le PPV. Une grande homologie existe entre les virus faisant partie de ce genre. De ce fait, les connaissances acquises chez le PPV pourraient être applicables aux autres parvovirus et vice versa.

Le PPV est un petit virus non-enveloppé et comporte un ADN simple brin de polarité négative. Celui-ci code pour trois protéines non-structurales (NS1, NS2 et NS3), et deux protéines structurales (VP1 et VP2). Une troisième protéine structurale, VP3, est générée par un processus de maturation qui implique le clivage de la partie N-terminale de VP2 par des enzymes extra-cellulaires. Les trois protéines structurales possèdent la même séquence codante, mais diffèrent dans la longueur de leur extrémité N-terminale.

La capsid virale du PPV est de symétrie icosaédrale et est composée de 60 copies des protéines structurales. Elle est constituée de VP2 et VP3 à 80-90%, ainsi que de VP1 à 10-20%. Cependant dans le cas des virus non-matures, la capsid n'est formée que de VP2 et VP1. La traduction des protéines structurales se localise au niveau du cytoplasme. Par contre, peu d'information existe par rapport au transport de ces dernières jusqu'au noyau, ainsi que l'assemblage en capsid virale. Plusieurs études suggèrent qu'une oligomérisation en dimère, trimère ou pentamère de ces protéines serait nécessaire avant l'assemblage de la capsid. Toutefois, aucune étude n'a démontré si la translocation au noyau des protéines structurales se faisait à partir de monomère, d'oligomère ou de capsid partiellement formée.

Étant donné que la VP2 est la composante majoritaire de la capsid et qu'elle possède des régions conservées parmi les membres du genre *Parvovirus*, il est possible que ces régions jouent un rôle important dans la formation de la capsid. À cette fin, 26 mutations furent créées par un « alanine scan » dans ces régions conservées, et les phénotypes de ces résidus mutés furent ensuite analysés par immunofluorescence (IF) et microscopie confocale.

Cette étude démontre que les régions conservées de la VP2 jouent un rôle essentiel dans la formation de la capsid, plus précisément dans l'oligomérisation, la translocation et l'assemblage des protéines structurales pour donner la forme finale de la pro-capsid.

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Généralités du Parvovirus Porcin

En 1965, Howard Dunne découvre le syndrome SMEDI (Stillbirth, Mummified, Embryonic Death and Infertility) chez le porc. Ce syndrome fut associé à la reproduction porcine (Dunne *et al.*, 1965). Une dizaine d'années plus tard, il fut démontré que l'agent causal est le parvovirus porcin (PPV) (Mengeling *et al.*, 1976).

1.1 Transmission et virémie

Le PPV touche les élevages porcins dans le monde entier, causant des pertes économiques considérables. Ce virus peut rester jusqu'à quatre mois dans l'environnement sans inactivation et cette résistance facilite sa transmission (Mengeling, 1972). Le PPV se transmet de façon horizontale et verticale.

La transmission horizontale est plus fréquente et utilise les voies orales-fécales et oronasales. En effet, la source majeure de dissémination du PPV est son excrétion dans les selles et les sécrétions orales pendant la phase aiguë de l'infection (Paul *et al.*, 1980). La transmission verticale quant à elle, se fait de la mère à l'embryon ou au fœtus. Chez une truie séronégative en gestation, l'infection par le PPV engendre une virémie chez la mère suivie de la mort de l'embryon. Cette virémie semble être nécessaire pour que le PPV traverse la barrière placentaire afin d'infecter les embryons ou fœtus. La transmission entre les fœtus se produit par dissémination intra-utérine. Durant les 35 premiers jours de gestation, l'exposition des embryons ou fœtus au virus engendre leur dégénération et leur résorption. Entre 35 et 70 jours, l'exposition cause la mort et la momification des fœtus. En revanche, après 70 jours de gestation, les fœtus deviennent immunocompétents et peuvent combattre l'infection (Mengeling *et al.*, 1988; Nielsen *et al.*, 1991). Toutefois, l'infection par des souches hautement pathogènes entraîne la mort fœtale même si l'immunocompétence est acquise (Kresse *et al.*, 1985).

Il faut au PPV 23 à 32 jours pour causer une virémie et traverser la barrière placentaire lorsqu'il est transmis par voie orale; et 15 jours dans le cas d'une transmission intra-musculaire (Joo *et al.*, 1976). Il a été suggéré que chez les animaux adultes, une infection au PPV est inoffensive exceptée pour les souches associées à des entérites et des dermatites (Kresse *et al.*, 1985). En effet, la souche Kresse peut exacerber une épidermite exsudative causée par une bactérie, *Staphylococcus hyicus* (Whitaker *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2004).

1.2 Souches et pathogénie

Une forte identité de séquence existe entre les différentes souches du PPV. Malgré cette ressemblance, les souches sont divisées en quatre groupes selon leur pathogénicité. Le premier groupe contient les souches non-pathogènes dont KBSH et NADL-2. Cette dernière est utilisée comme vaccin atténué en raison de sa virémie limitée et de son incapacité à traverser le placenta. Par contre, si la souche NADL-2 est injectée directement dans l'utérus, plus précisément dans les fluides allantoïques, une virémie et la mort embryonnaire sont observées (Mengeling *et al.*, 1976). Ceci suggère que NADL-2 est non-pathogène car elle ne peut pas traverser la barrière placentaire pour se rendre aux embryons ou fœtus.

Le deuxième groupe comprend NADL-8 une souche pathogène pour les fœtus qui sont à moins de 70 jours de gestation et donc non-immunocompétents. Elle peut causer une virémie, traverser le placenta, et entraîner la mort des fœtus (Mengeling *et al.*, 1975).

La souche Kresse (Kresse *et al.*, 1985) a un large tropisme tissulaire et constitue le groupe le plus pathogène (Choi *et al.*, 1987; Oraveerakul *et al.*, 1993). En effet, cette souche peut même affecter les fœtus immunocompétents. Ainsi, ce groupe a un pouvoir accru pour provoquer des maladies et problèmes au niveau du système reproducteur et au niveau fœtal. Il faut noter que la différence entre les séquences des souches NADL-2 et de Kresse déterminant leurs tropismes cellulaires respectifs, est de trois acides aminés,

D³⁷⁸→G; H³⁸³→Q; S⁴³⁶→P situés au niveau de la capsid (Bergeron *et al.*, 1996). Ces résidus sont positionnés à la surface et autour des spicules (axes de symétrie d'ordre 3) et des fossettes (axes de symétrie d'ordre 2) (Simpson *et al.*, 2002). Le changement de ces trois résidus est suffisant pour modifier le phénotype *in vitro* de NADL-2 en Kresse et vice versa (Bergeron *et al.*, 1996).

Enfin, le dernier groupe, constitué de la souche IAF-A83, a été isolé et relié à des problèmes entériques (Bergeron *et al.*, 1996, non-publié). Les virus appartenant à ce groupe sont antigéniquement différents des virus regroupés dans les autres groupes pathogéniques. Le rôle de cette souche par rapport à la diarrhée reste à être déterminé.

1.3 Taxonomie

La famille *Parvoviridae* regroupe des petits virus non-enveloppés ayant un ADN simple-brin, et possédant une capsid à symétrie icosaédrique. Elle est divisée en deux sous-familles, *Parvovirinae* et *Densovirinae*, comprenant cinq et quatre genres respectivement. Les genres *Densovirus*, *Iteravirus*, *Brevidensovirus* et *Pefudenovirus* appartiennent à la sous-famille *Densovirinae* et infectent les invertébrés. Les genres *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* et *Bocavirus* qui composent la sous-famille *Parvovirinae*, infectent quant à eux les vertébrés (Tattersall *et al.*, 2005). Le genre *Dependovirus* contient les AAV (Adeno-Associated Virus), des virus non-autonomes qui nécessitent un virus auxiliaire pour se répliquer efficacement. Le genre *Erythrovirus* comporte des virus autonomes dont le parvovirus B19. Le B19 est un virus humain qui cause, entre autre, la cinquième maladie chez l'enfant également connue sous le nom d'érythème infectieux. De plus, il est associé chez l'adulte à des problèmes d'arthrite et d'avortement. Le genre *Amdovirus* contient un seul virus qui infecte le vison (Aleutian mink disease virus). Ce virus cause une infection persistante associée à des troubles progressifs du système immunitaire chez les animaux adultes (Tattersall *et al.*, 2005). Un virus bovin (Bovine parvovirus) et un virus canin (Canine minute virus) appartiennent au genre *Bocavirus* dont la séquence de l'ADN est distincte de tous les autres virus dans la

sous-famille *Parvovirinae*. De plus, leur génome code pour une phosphoprotéine nucléaire NP-1 qui n'est pas retrouvée chez les autres membres de la même sous-famille (Tattersall *et al.*, 2005). Le genre *Parvovirus*, auquel appartient le PPV, regroupe plusieurs virus autonomes d'animaux. Ces virus possèdent une grande ressemblance par rapport à leurs génomes, leurs protéines et leurs capsides. Les parvovirus les plus étudiés dans ce genre sont le parvovirus canin (CPV), le parvovirus félin (FPV), le parvovirus porcine (PPV) et le parvovirus murin (MVM) (Mengeling *et al.*, 1988; Simpson *et al.*, 2002).

1.4 Cellules cibles

Les parvovirus, incluant le PPV, nécessitent que la cellule hôte soit en division pour initier leur propre réplication, car ils sont incapables d'entraîner les cellules non-réplicatives à entrer en phase S. Des facteurs cellulaires inconnus présents lors de la phase S tardive et de la phase G2 précoce du cycle réplicatif de la cellule, sont essentiels pour la réplication du virus. Le PPV cible essentiellement des cellules en mitose active telles que les cellules embryonnaires ou fœtales, les jeunes animaux, ainsi que les tissus d'adultes dont les cellules sont en prolifération comme les cellules hématopoïétiques (Cotmore *et al.*, 1995; Tijssen *et al.*, 1999).

Le PPV a été isolé à partir de plusieurs types de tissus tels que les poumons, les leucocytes, la semence germinale, les lésions vésiculaires ainsi que dans les selles (Molitor *et al.*, 1985). *In vitro*, le PPV est cultivé dans des lignées cellulaires permanentes qui proviennent de tissus de fœtus de porc comme les cellules ST et PT (testicules) et PK-14 (reins) (Siegl, 1984; Bergeron *et al.*, 1993).

La plupart des parvovirus ont la capacité d'agglutiner les érythrocytes de plusieurs espèces animales. L'hémagglutination s'effectue par l'attachement des capsides virales aux résidus d'acide N-acétylneuraminique se trouvant à la surface des érythrocytes. Aucune fonction biologique n'a été attribuée à cette propriété d'hémagglutination (Barbis

et al., 1992). Cependant, cette dernière est largement exploitée en laboratoire. En effet, en standardisant le titre d'hémagglutination (HA), il est possible de doser les capsides virales. De plus, grâce au test d'inhibition d'hémagglutination (HAI) utilisant des anticorps ou des antisérums neutralisants, différentes souches de parvovirus peuvent être identifiées (Cotmore *et al.*, 1987).

1.5 Propriétés physiques

Les parvovirus sont très stables et résistants à plusieurs solvants organiques tels que le butanol, le tétrachlorure de carbone, l'alcool et le chloroforme ainsi qu'à diverses enzymes comme la DNase, la RNase, la pepsine et la trypsine. Le PPV est également stable à des intervalles de pH variant entre 3 et 9 et à des températures jusqu'à 70°C. En revanche, il est sensible aux rayons UV, au détergent SDS (dodécyl sulfate de sodium), à la formaline, au β -propiolactone et aux agents oxydants (Siegl *et al.*, 1985; Arella *et al.*, 1990; Tijssen *et al.*, 1999). Cette résistance aux traitements physiques, chimiques et enzymatiques facilite la purification virale.

Sur un gradient de chlorure de césium (CsCl), les particules virales sont groupées en trois bandes. La première bande d'une densité de 1.41-1.43 g/cm³ représente les particules dites « pleines légères »; la deuxième bande, souvent mineure, est d'une densité de 1.45-1.47 g/cm³ et regroupe les particules virales « pleines lourdes ». Ces deux types de particules virales contiennent de l'ADN viral. Cependant, la composition en protéines structurales, VP2, qui forment majoritairement la capsid virale, est différente. La troisième bande, à une densité de flottaison de 1.32 g/cm³, représente les particules vides qui ne contiennent pas le génome viral (Tattersall *et al.*, 1976).

2. Aspects moléculaires

La structure de la capsid virale du PPV a été déterminée par cristallographie aux rayons-X (Simpson *et al.*, 2002). La capsid a un diamètre d'environ 25 nm, elle est de symétrie icosaédrale T=1 et est composée de 60 copies de protéines structurales (figure 1a). Le génome du parvovirus porcine est d'une longueur d'environ 5 kb. L'ADN viral est simple brin, de polarité négative et contient des séquences palindromiques à ses deux extrémités. Les virus du genre *Parvovirus* tels que le PPV, MVM, CPV, et FPV se ressemblent beaucoup et les similitudes existent au niveau des protéines virales, de la taille du génome et de l'encapsulation du brin négatif d'ADN.

2.1 Arrangement génomique

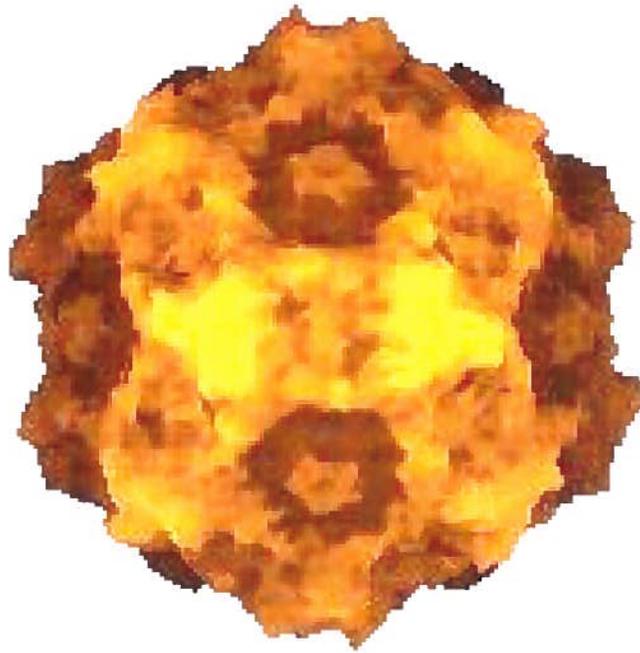
Le génome du PPV code pour au moins cinq protéines, dont trois sont des protéines non-structurales (NS) et les deux autres sont structurales (VP) (figure 1b). Il contient deux grands cadres de lecture ouverts (ORFs). Ces deux ORFs sont situés dans la même orientation sur le brin positif et chacun contient une unité transcriptionnelle distincte avec un promoteur. L'ORF de gauche code pour les gènes des protéines non-structurales NS1, NS2 et NS3, sous le contrôle du promoteur P4. L'ORF de droite assure quant à lui, l'expression des protéines structurales VP1 et VP2 sous le contrôle du promoteur P40 (figure 1b) (Cotmore *et al.*, 1987 et 1995). Les extrémités 5' et 3' du génome contiennent des structures secondaires bicaténares en épingles à cheveux (Bourguignon *et al.*, 1976). La longueur de l'extrémité 5' est de 220 nucléotides et celle de 3' de 117 nucléotides chez le PPV (Bergeron *et al.*, 1993; Tijssen *et al.*, 1995). Ces séquences terminales sont principalement impliquées dans la réplication virale. L'extrémité 3' peut se replier pour former un Y qui sert d'amorçage pour la réplication afin de générer l'ADN double brin nécessaire à la transcription. De plus, elle module l'activité des promoteurs. En forme de cruciforme, l'extrémité 5' est impliquée dans la réplication du génome selon le modèle de « cercle roulant » (Bourguignon *et al.*, 1976; Bergeron *et al.*, 1993).

Récemment, une étude chez le PPV a démontré l'existence d'un ORF de petite taille nommé SAT (small alternatively translated protein), à l'extrémité 5' de l'ORF de la VP2. Tous les membres du genre *Parvovirus* contiennent ce petit ORF d'environ 60 codons situé en aval du codon d'initiation de VP2. Seulement quatre nucléotides séparent l'ATG de VP2 et celui du petit ORF, à l'exception du PPV où sept nucléotides les séparent. L'ORF-SAT code pour une protéine NS tardive localisée dans le réticulum endoplasmique où elle causerait un stress entraînant la lyse cellulaire. De plus, le virus utiliserait cette protéine pour échapper au système immunitaire (Zádori *et al.*, 2005).

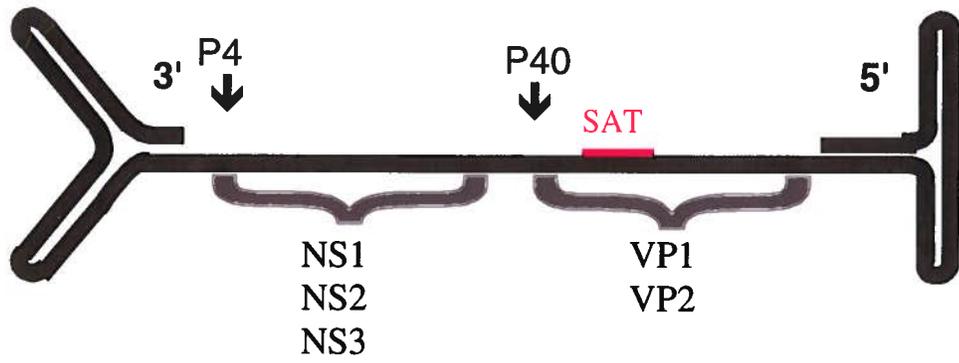
Figure 1 : Le parvovirus porcine

- A) La structure de la capsid virale du PPV a été déterminée par cristallographie aux rayons-X (Simpson *et al.*, 2002).
- B) L'arrangement du génome viral (Bergeron *et al.*, 1993, 1996). Deux promoteurs : P4 assure la transcription de l'ARNm des protéines non-structurales (NS1, NS2 et NS3) et P40 assure la transcription de l'ARNm des protéines structurales (VP1 et VP2). La position de l'ORF du SAT est soulignée en rouge. Les deux extrémités palindromiques sont de type épingles à cheveux.

A



B



2.2 Épissage alternatif

Pour augmenter la capacité codante du génome virale, l'épissage alternatif est utilisé (Bergeron *et al.*, 1993, 1996). Le génome contient deux cadres de lecture ouvert (ORF) et deux promoteurs qui contrôlent l'expression de deux transcrits primaires. Ces deux transcrits peuvent subir un épissage alternatif (figure 2). En premier lieu, le promoteur P4 va générer un transcrit primaire qui, après maturation, peut contenir plusieurs types d'introns. Le premier type peut être constitué de deux petits introns soit a ou b (R1) ou un plus grand intron c (R2) ou bien subir un saut d'intron « intron skipping » (d, R3). Les introns a/b sont aussi présents dans le transcrit primaire du promoteur P40, donnant R4 et R5.

La région codante de NS1 est en amont des petits introns du transcrit R1. Le transcrit R2 contient une excision du grand intron et donne la séquence codante pour la protéine NS2. Pour NS3, le transcrit R3 est épissé entre le site donneur du grand intron jusqu'au site accepteur des petits introns. Par conséquent, il y a chevauchement de la région codante de NS3 avec celle des protéines structurales (figure 2) (Bergeron *et al.*, 1993).

Chez le MVM, il existe un deuxième site accepteur, A2, pour les petits introns, qui a pour effet d'augmenter les combinaisons d'épissage. Par ailleurs, les deux petits introns se trouvent dans le cadre de lecture des protéines non-structurales et non en aval de cette région comme chez le PPV (Pintel *et al.*, 1995). De ce fait, trois types d'isoformes de NS2 existent chez le MVM, par contre aucune NS3 n'est présente. Il est possible que NS3 soit formée pour compenser l'absence des isoformes de NS2 chez le PPV (Bergeron *et al.*, 1993; Cotmore *et al.*, 1995).

Les transcrits R4 et 5 codent pour les protéines structurales VP1 et VP2. Les deux petits introns sont délimités par deux sites donneurs et un site accepteur. Le premier site donneur, D1, se trouve en amont du codon de départ de VP1. L'épissage à ce site a pour effet d'éliminer le codon de départ de VP1 et l'utilisation de celui de VP2. Le deuxième

site donneur, D2, se trouve en aval du codon de départ de VP1 et en amont de celui de VP2, l'utilisation de ce donneur produit la protéine VP1 (figure 2) (Bergeron *et al.*, 1993) .

L'épissage alternatif est un moyen d'augmenter la capacité codante du génome et de moduler de l'expression des protéines virales. La force d'épissage des sites donneurs et accepteurs détermine la quantité de transcrits matures produits, ce qui module le niveau d'expression des protéines (Pintel *et al.*, 1995). En effet, l'épissage alternatif est une stratégie utilisée par le PPV dans le but de favoriser l'expression de la VP2, au détriment de la VP1, celle-ci ayant une structure plus encombrée pour former la capsidie en raison de sa région unique amino-terminale (N-terminale).

Figure 2 : Épissage alternatif

Cinq types de transcrits résultent de l'épissage, R1 (4.7 kb), R2 (3.3 kb), R3, R4 et R5 (2.9 kb chacun).

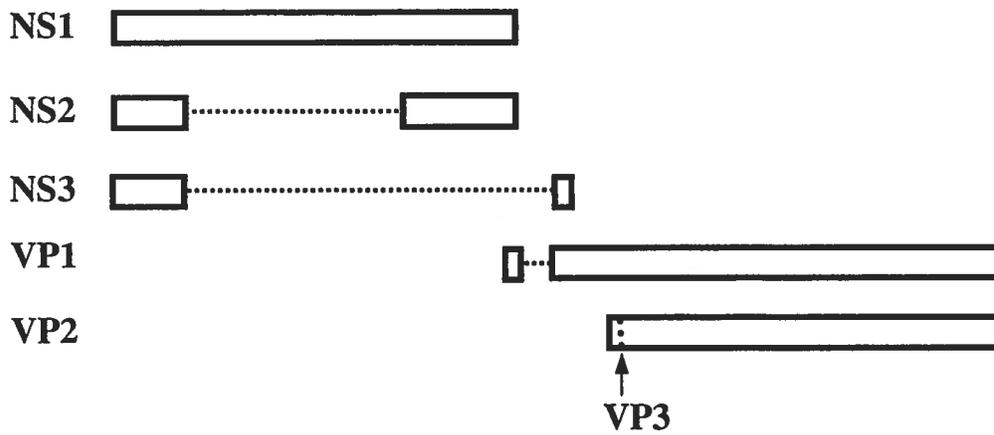
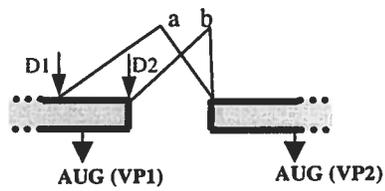
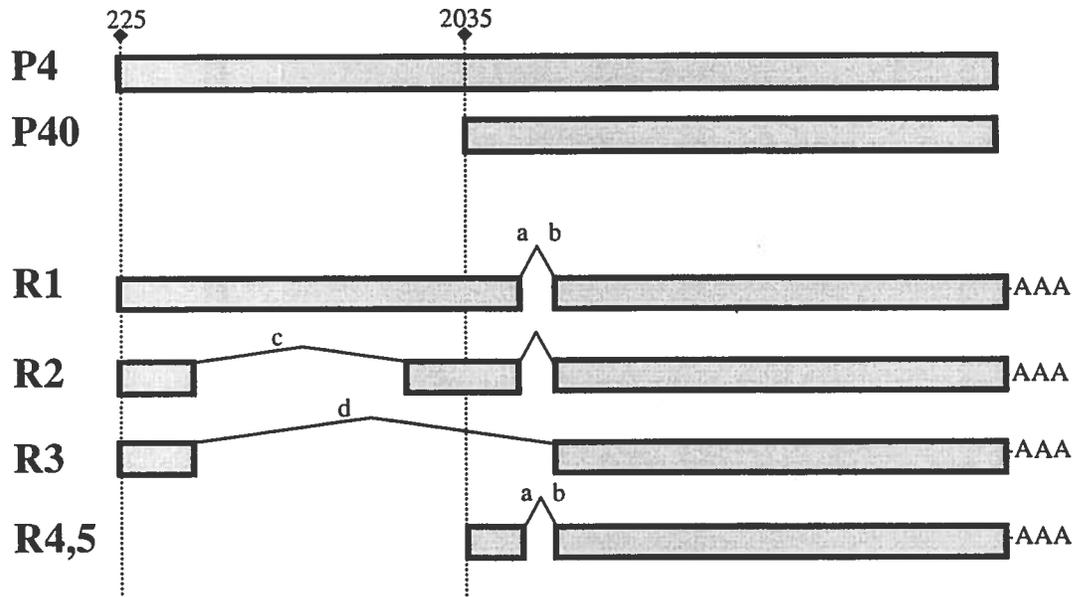
La transcription contrôlé par P4 commence à la position 225 sur le gène, et celle du P40 à la position 2035.

R1 se traduit en NS1, à noter qu'aucun épissage existe dans l'ORF de NS1.

R2 se traduit en NS2, un épissage existe démontré par c dans la figure.

R3 se traduit en NS3, un épissage existe démontré par d.

À partir des transcrits R4 et R5, deux protéines VP1 et VP2 sont traduites selon le type donneur utilisé. Deux sites donneurs existent : D1 à la position 2280-AG/GT et D2 à la position 2313-AG/GT. Il n'existe qu'un seul site accepteur A1 2386-AG/GA. D1 se trouve en amont du codon d'initiation de VP1. D2 est en aval du codon d'initiation de VP1. Ainsi, un épissage de D1/A1 (démontré par a dans la figure) produit VP2 et D2/A1 (démontré par b dans la figure) donne VP1 (Bergeron *et al.*, 1993). La polyadénylation (queue PolyA) des ARN messagers (ARNm) est représentée par une séquence de A à leur extrémité droite.



2.3 Protéines non-structurales

Le PPV code pour trois protéines non-structurales : NS1, NS2 et NS3. NS1, d'une masse moléculaire de 83 kDa (Bergeron *et al.*, 1993), est produite lors de la phase précoce de la réplication virale (Molitor *et al.*, 1985). Elle possède une forte identité avec les NS1 des autres parvovirus. Plusieurs fonctions, telles que des activités ATPase, hélicase et endonucléase, lui ont été attribuées (Vanacker *et al.*, 1995). NS1 peut également s'attacher à l'ATP, ainsi qu'à l'ADN de manières covalente et non-covalente. Par ailleurs, elle est capable de transactiver le promoteur P40 et de réguler son propre promoteur (Vanacker *et al.*, 1995; Doerig *et al.*, 1988). NS1 est essentielle dans la réplication virale et peut aussi jouer un rôle dans l'encapsidation de l'ADN viral. Chez le PPV, le rôle de NS1 n'a pas encore été déterminé. Cependant, sa grande similarité avec les NS1 des autres parvovirus, suggère qu'elle aurait les mêmes fonctions que ces dernières (Cotmore *et al.*, 1995; Tijssen *et al.*, 1995).

La fonction de la protéine NS2, un polypeptide de 25 kDa (Bergeron *et al.*, 1993), est moins définie. Des études ont démontré qu'elle serait impliquée dans la réplication du génome viral, la régularisation de la synthèse des protéines virales et l'assemblage de la capsid (Naeger *et al.*, 1990; Li *et al.*, 1991 & 1993; Cotmore *et al.*, 1999). Trois isoformes de NS2 existent chez plusieurs parvovirus mais il n'y en a qu'un seul chez le PPV. La présence d'une troisième protéine non-structurale, NS3, uniquement chez le PPV, pourrait compenser l'absence des isoformes de NS2, par contre, la fonction de NS3 est jusqu'à présent inconnue (Bergeron *et al.*, 1993).

La masse moléculaire de NS3 est de 12.4 kDa (Bergeron *et al.*, 1993). Elle contient la même extrémité N-terminale que NS1 et NS2. Cependant, elle diffère de celles-ci au niveau de l'extrémité carboxy-terminale (C-terminale). La région codante de NS3 à l'extrémité C-terminale chevauche le cadre de lecture ouvert des protéines structurales. Le transcrit de NS3 a été identifié et séquencé mais la production de cette protéine n'a jamais été démontrée. (Bergeron *et al.*, 1993; Tijssen *et al.*, 1999).

2.4 Protéines structurales

La capside virale est formée par les protéines structurales VP1, VP2 et VP3. Les séquences codantes de VP1 et de VP2 sont superposées. Par conséquent, l'épissage alternatif permet aux VPs de partager la même extrémité C-terminale et de différer seulement dans la longueur de leur extrémité N-terminale (figure 3).

La VP1, d'une masse moléculaire de 84 kDa (Tijssen *et al.*, 1995), compose 10% à 20% de la capside virale. La présence de cette protéine est essentielle à l'infectivité du virus. À son extrémité N-terminale, la VP1 possède une région unique de 150 acides aminés (VP1up). Cette région contient une séquence codant pour une phospholipase A₂ (PLA₂) (Zádori *et al.*, 2001), un signal de localisation nucléaire (SLN), et d'autres séquences dont la fonction demeure inconnue. Dans une étude récente, des mutations ont été introduites dans la VP1 afin d'éliminer la PLA₂. L'étude du phénotype de ces mutants a démontré que le virus s'accumule dans les endosomes tardifs ainsi que dans les lysosomes, et que l'ADN viral n'est pas livré au noyau (Zádori *et al.*, 2001). Cette étude a souligné l'importance de la PLA₂ dans l'infectivité virale. Le signal de localisation nucléaire (SLN) joue un rôle dans le transport et la translocation de VP1 dans le noyau (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997; Lombardo *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002).

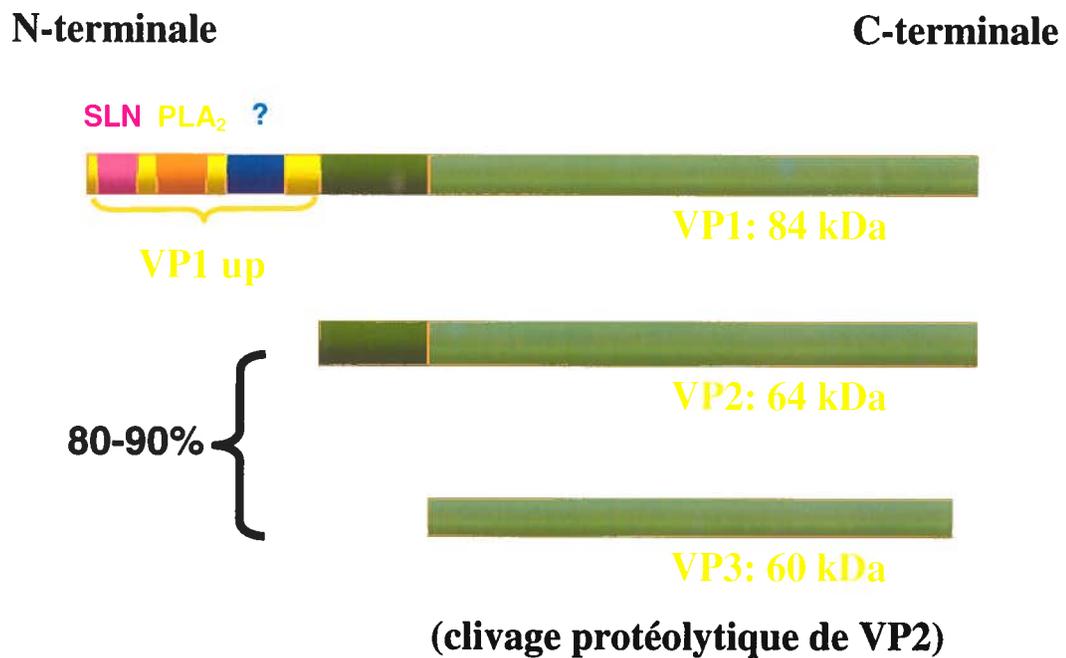
La VP2 quant à elle, a une masse moléculaire de 64 kDa et est composée de 580 acides aminés (Tijssen *et al.*, 1995). VP2 et VP3 composent ensemble 80-90% de la capside virale. Contrairement à VP1, VP2 peut former la capside à elle seule. À son extrémité N-terminale, la VP2 contient une région conservée riche en glycines qui lui confère une flexibilité permettant l'externalisation de cette région par le canal cylindrique. Ce dernier est situé dans la capside au niveau des axes de symétrie d'ordre 5. La région N-terminale de VP2, d'environ 20 acides aminés, est externalisée seulement dans les virions pleins. Elle peut alors être clivée par des enzymes protéolytiques extracellulaires pour donner naissance à VP3 (Tsao *et al.*, 1991; Simpson *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 1993).

La masse moléculaire de VP3 est de 60 kDa (Bergeron *et al.*, 1993 & 1996). Elle est générée par un processus de maturation de VP2. Cependant, le stade auquel se déroule cette maturation, ainsi que l'enzyme cellulaire impliquée dans le clivage sont encore inconnus.

Le tropisme, l'hémagglutination et le spectre d'hôtes susceptibles sont des propriétés déterminées par la composition de la capsid virale, plus précisément, par les protéines structurales (Parrish *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1992; Truyen *et al.*, 1992; Bergeron *et al.*, 1996).

Figure 3 : Les protéines structurales

Les protéines structurales contiennent la même extrémité C-terminale et varient par la longueur de l'extrémité N-terminale. La VP1 contient une partie unique nommée VP1up. Cette région contient un signal de localisation nucléaire (SLN), une séquence codant pour une phospholipase A₂ (PLA₂) et d'autres séquences de rôle inconnu. La VP1 compose 10 à 20 % de la capsid virale. Les protéines VP2 et VP3 forment 80-90% la capsid. VP3 est produite par un clivage protéolytique de la région N-terminale de la VP2. La maturation de VP2 en VP3 est un processus extracellulaire.



Tijssen & al., 1995

2.5 Cycle et réplication viraux

Plusieurs recherches ont démontré que le virus peut être internalisé dans des cellules permissives et non-permissives. Cependant, la production virale n'a lieu que dans les cellules permissives (Oraveerakul *et al.*, 1992). Ceci laisse présager que des interactions avec des facteurs intracellulaires déterminant la permissivité cellulaire, définissent le tropisme viral.

Les étapes exactes du cycle viral sont encore peu connues. Premièrement, il y a attachement du virus à la surface de la cellule via un récepteur inconnu. Dans le cas du PPV, un anticorps monoclonal peut établir une compétition avec le virus pour l'attachement à une molécule membranaire. Cette dernière, d'une masse de 40 kDa, se trouve sur les cellules permissives de testicules de porc, mais elle est également présente sur des lignées cellulaires non-permissives. Toutefois, cette protéine n'est pas encore caractérisée, ni identifiée comme récepteur potentiel du PPV (Harding *et al.*, 1992). L'attachement est suivi de l'endocytose et du transport du virus par la voie endosomale. Pour le CPV, le virus est transporté par cette voie dans des vésicules tapissées de clathrine (Parker *et al.*, 2001).

Le virus CPV se co-localise avec la transferrine dans les vésicules de recyclage périnucléaire (Parker *et al.*, 2001). Le PPV se co-localise quant à lui avec la glycoprotéine lysosomale majeure, Lamp-2 qui se trouve dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Zádori *et al.*, 2001). Le transport du CPV dans les endosomes tardifs dépend des microtubules. En effet, la dépolymérisation des microtubules par une drogue, le nocodazole, inhibe le passage du virus des endosomes précoces aux endosomes tardifs, et donc l'infectivité du virus (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998).

L'acidification des vésicules dans la voie endosomale permettrait au virus d'exposer la région unique de VP1 et donc la phospholipase A₂. Celle-ci joue un rôle dans l'infectivité virale en permettant possiblement l'évasion au cytoplasme (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998; Zádori *et al.*, 2001). Toutefois, l'acidification n'est pas l'unique étape requise

pour l'infectivité du virus. Des particules de CPV pré-traitées dans un milieu acide et micro-injectées directement dans le cytoplasme n'entraînent pas une infection (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). Cette étude démontre que le transport du virus par la voie endosomale est indispensable à une infection productive.

Le génome viral est livré au noyau par un mécanisme inconnu. Étant donné que l'ADN viral n'est pas décelé dans le cytoplasme, il est possible que les particules virales soient décapsidées seulement au niveau des pores nucléaires ou dans le noyau (Basak *et al.*, 1992; Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Il a également été suggéré que le virus utilise le SLN de la VP1 pour être transporté au noyau (Cotmore *et al.*, 1987; Tijssen *et al.*, 1999). Une fois dans le noyau, la phase S de la cellule est nécessaire pour permettre au génome viral d'emprunter la machinerie cellulaire pour sa propre réplication. En premier lieu, l'extrémité 3' sert d'amorce à la polymérase cellulaire pour obtenir la forme double brin du génome qui va servir à la transcription et l'expression de la protéine NS1. Pour la réplication de leur génome, les parvovirus incluant le PPV utilisent le modèle « cercle roulant » dans lequel NS1 joue ses rôles d'endonucléase et d'hélicase. Finalement, l'ADN est excisé en forme monocaténaire et le brin négatif est encapsidé (Tattersall *et al.*, 1976; Cotmore *et al.*, 1995).

Les premières protéines virales traduites sont les protéines non-structurales. Lorsque celle-ci s'accumulent dans la cellule hôte, elles causent une inhibition de la réplication cellulaire mais, elles stimulent la réplication virale. De plus, l'accumulation de ces protéines est cytotoxique pour la cellule hôte. NS1 joue un rôle essentiel dans la réplication virale, régule à la hausse son propre promoteur et transactive le promoteur P40. Ce dernier exprime les ARNms qui se traduisent en protéines structurales VP1 et VP2 (Doerig *et al.*, 1988; Cotmore *et al.*, 1995).

Par la suite, les protéines structurales sont traduites et transportées au noyau pour s'assembler en pro-capside virale. L'ADN viral simple brin de polarité négative est ensuite introduit dans des capsides partiellement ou totalement formées. La NS1 jouerait un rôle dans l'encapsidation. Cette dernière interagit avec l'extrémité 5' de l'ADN simple

brin nouvellement synthétisé (Cotmore *et al.*, 1995). De plus, la capsid virale peut encapsider l'ADN viral seul ou en interaction avec NS1 (Cotmore *et al.*, 1995). Finalement, après une période de 16 à 20 heures, les virions synthétisés *de novo* sont relâchés par lyse cellulaire (Jacoby *et al.*, 1996).

2.6 La capsid virale

Les parvovirus possèdent une capsid non-enveloppée de symétrie icosaédrale avec une lattice de triangulation (T) égale à un. T représente le nombre de copies des sous-unités de protéines qui occupent l'unité asymétrique icosaédrale dans une capsid. Pour le PPV, la capsid a un diamètre d'environ 25 nm et est composée de 60 capsomères, c'est-à-dire les 20 faces de la capsid sont chacune composées d'un trimère de VP1-3 (Simpson *et al.*, 2002).

2.6.1 Structure secondaire

Chaque unité de protéine est repliée en une structure de baril- β , formée de huit brins anti-parallèles qui se plient en deux feuillets β (Agbandje *et al.*, 1995). De plus, plusieurs boucles larges se trouvent entre ces deux feuillets. Ces deux types de structures constituent ensemble la forme majoritaire de la capsid. La forme finale de la capsid est déterminée par des interactions entre les protéines structurales. Ces dernières forment des oligomères qui s'assemblent en capsid icosaédrale. Les résidus qui forment la structure du baril- β sont positionnés du côté interne de la capsid et sont très conservés. Du fait de leur positionnement, ces résidus sont inaccessibles aux interactions externes (Chapman *et al.*, 1993; Simpson *et al.*, 2002). L'homologie des parvovirus est élevée au niveau de la composition interne de la capsid, et varie majoritairement dans celle des résidus externes. Ces derniers sont impliqués dans le tropisme, la barrière d'espèces et l'hémagglutination (Agbandje *et al.*, 1995; Tijssen *et al.*, 1995).

2.6.2 Les axes de symétrie

Trois axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 déterminent la symétrie de la capsid. Dans la figure 4, les protéines de la capsid sont colorées pour souligner cette symétrie. Une protubérance est observée sur l'axe de symétrie d'ordre 3. Cette élévation de 22Å par 70Å est nommée spicule et est formée par une interaction de trois protéines inter-reliées de façon symétrique. En raison de cette interaction, il est suggéré que le premier assemblage des protéines structurales soit en trimères (Wu *et al.*, 1993; Agbandje *et al.*, 1995; Lombardo *et al.*, 2000 & 2002). À l'axe de symétrie d'ordre 2, une dépression, nommée fossette, est observée. Elle est formée par l'interaction entre deux protéines. L'axe de symétrie d'ordre 5, au centre d'un pentamère, est caractérisé par une structure cylindrique formant un canal (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995). Ce dernier joue un rôle dans l'internalisation de l'ADN viral et l'externalisation de l'extrémité N-terminale de la VP1 (Hueffer *et al.*, 2003). Autour des axes de symétrie d'ordre 5, on retrouve également des dépressions nommées « canyons ».

Le tropisme viral est gouverné par un changement minimal dans la séquence de la capsid. Chez le PPV, le tropisme des souches NADL-2 et Kresse est influencé par trois acides aminés critiques qui se trouvent à l'extérieur de la capsid. Les résidus D378 et H383 sont situés sur une pente entre les axes de symétrie d'ordre 2 et 5. Le troisième acide aminé, S436 se trouve sur les spicules de l'axe de symétrie d'ordre 3 (Bergeron *et al.*, 1996; Tijssen, 1999). Des résidus similaires se trouvent chez le MVM et le CPV. De plus, des sites antigéniques majeurs sont présents dans cette région. Ces déterminants antigéniques soulignent l'importance des résidus qui se positionnent autour et sur les spicules, vis-à-vis du tropisme et de l'évolution des parvovirus (Hueffer *et al.*, 2003).

2.6.3 L'assemblage de la capsid

La capsid est constituée de l'oligomérisation des protéines de structures. Trois types d'oligomères existent dans la capsid, soit des dimères, des trimères et des

pentamères. Cependant, aucune étude n'a pu démontrer quel oligomère serait formé en premier, ni sous quelle forme les protéines se transloquent au noyau pour l'assemblage de la capsid.

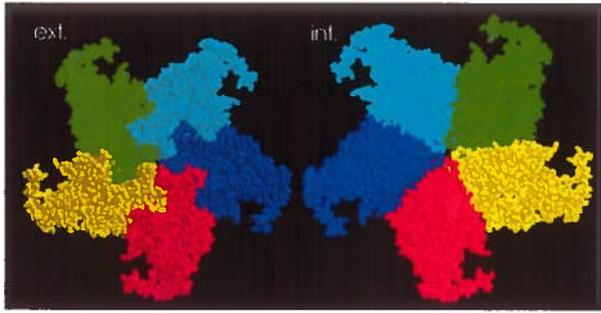
L'équipe de Lombardo *et al.* (2000 et 2002) a montré que la VP1 et la VP2 coopèrent et interagissent pour être transportées au noyau chez le MVM. De plus, la VP1 pourrait être transportée sous forme de monomère. Cependant, la VP2 requiert une oligomérisation. Le transport de VP2 nécessite le bon repliement de la protéine pour former un signal de localisation nucléaire (SLN). Ces auteurs ont aussi suggéré qu'une oligomérisation de trois protéines serait nécessaire pour l'obtention du SLN (Lombardo *et al.*, 2000; Lombardo *et al.*, 2002). Chapman et Rossmann ont observé qu'un plus grand nombre de résidus interagissent ensemble autour de l'axe de symétrie d'ordre 3, comparativement aux deux autres axes (Chapman *et al.*, 1993). De plus, une autre étude a démontré que les trimères nécessitent une grande barrière d'activation pour se dissocier. Cette énergie de dissociation des trimères est beaucoup plus grande que celle des dimères et des pentamères (Xie *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que les trimères sont les premiers formés lors de l'oligomérisation des protéines structurales.

Figure 4 : La symétrie de la capsid virale

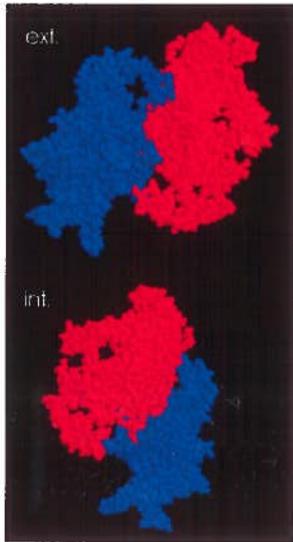
Trois axes gouvernent la symétrie de la capsid. Présentation des trois types d'oligomérisation avec une vue extérieure et intérieure, permettant de décrire la symétrie. Les protéines qui forment les oligomères sont mises en évidence en couleur, en accord avec la symétrie de la capsid qui est représentée au centre (C). (int. : intérieure; ext. : extérieure).

- A) Formation d'un pentamère avec les cinq protéines entourant l'axe de symétrie d'ordre 5. Elles forment un canyon autour de l'axe, tandis qu'au centre, se trouve un canal cylindrique.
- B) Des fossettes existent sur l'axe de symétrie d'ordre 2 où deux protéines sont en contact.
- C) Les protéines symétriques de la capsid mise en évidence en couleur, en accord avec A, B et D.
- D) L'axe de symétrie d'ordre 3 regroupe trois protéines inter-reliées pour former un spicule. Dans cette région, il existe un plus grand contact physique entre les protéines, comparativement aux autres formations.

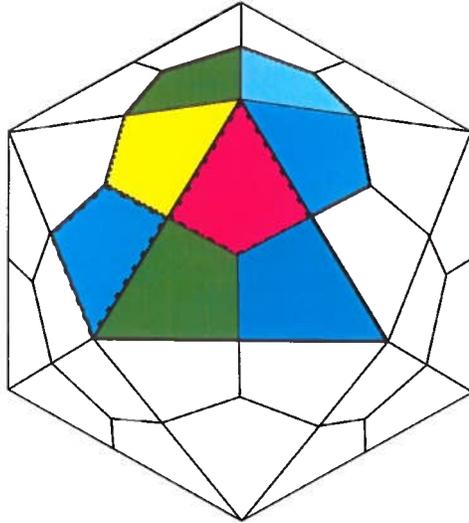
A



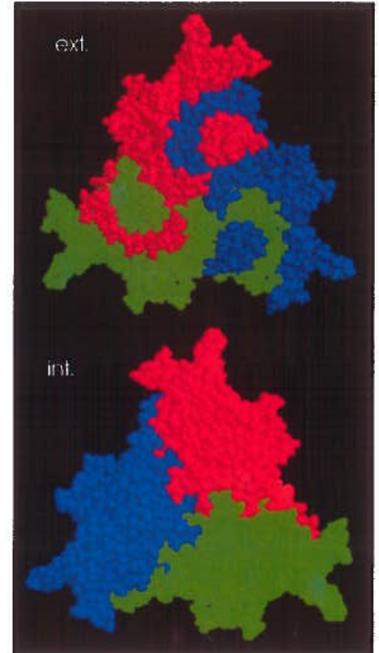
B



C



D



2.6.4 Rigidité structurale des acides aminés

Il existe une variation dans la flexibilité des acides aminés de la capsid (facteur de température) et un certain désordre des acides aminés composant la capsid est observé (figure 5-A, 5-B et 5-C). Cette stabilité est illustrée par une couleur variant de bleu foncé au rouge, du plus stable au moins stable, respectivement. L'observation de cette figure montre que les résidus les plus stables sont situés à l'intérieur de la capsid. Toutefois, cette stabilité est bien moindre pour les résidus externes, notamment pour ceux situés autour du canal cylindrique. Les acides aminés du côté extérieur sont plus variables puisqu'ils sont responsables de la spécificité du tropisme viral, du spectre d'hôte et d'autres fonctions dans la communication avec leur environnement particulier (Simpson *et al.*, 2002).

3. Les acides aminés conservés dans la VP2

La VP2 est la composante majeure du PPV et elle contient plusieurs régions conservées à travers sa séquence. Comme beaucoup de similitudes existent entre les membres de la famille parvovirus, un alignement de la séquence de la VP2 appartenant à ces derniers a été produit pour souligner toutes les régions conservées. La figure 5-D montre l'emplacement de ces derniers dans la capsid qui se localise du côté intérieur, dans la région bleu foncé. En général, les régions conservées d'un virus jouent des rôles critiques dans son cycle viral. Ainsi, l'étude de ces régions conservées de la VP2 pourrait amener à des découvertes importantes au niveau de la formation de la capsid et les effets que celles-ci causeraient au virus. Notre hypothèse propose que les régions conservées de la VP2 du PPV pourraient jouer un ou des rôles importants à plusieurs niveaux dans la formation de la capsid.

La capsid est formée par des protéines structurales qui lui donnent sa forme symétrique finale. Ainsi, la bonne conformation des protéines structurales est essentielle au bon repliement de la protéine, à l'obtention d'oligomères et finalement à la formation

d'une capsidie symétrique. Si les acides aminés mutés inhibent le bon repliement de la protéine au niveau monomère, l'oligomérisation, le transport au noyau et la formation de la capsidie virale seront bloqués. Par contre, les acides aminés mutés qui permettent la bonne conformation de la protéine et la formation d'oligomères, ceux-ci permettraient le transport au noyau et l'assemblage en capsidie virale.

Des régions conservées de la VP2, 22 acides aminés sont parmi les plus conservés à travers la famille parvovirus. Pour étudier l'effet de ces acides aminés conservés, des mutations ponctuelles sont créées en substituant le résidu conservé par un petit acide aminé neutre, alanine. Le phénotype de chacune des mutations créées est étudié par rapport à la formation de la capsidie et l'effet sur le cycle viral du PPV.

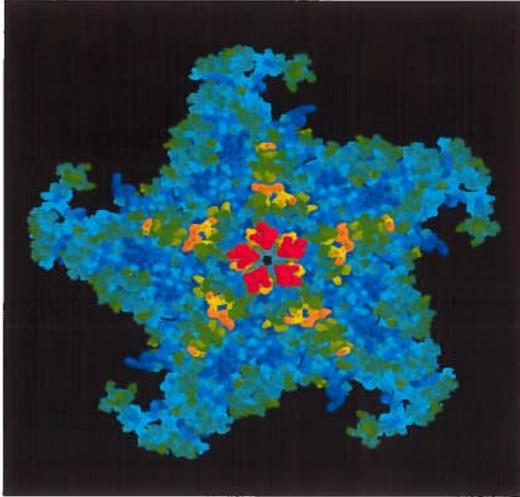
Figure 5 : Flexibilité et localisation des acides aminés conservés de la VP2 dans la capsid

La flexibilité des résidus formant la capsid est indiquée par un gradient de couleur variant du bleu foncé au rouge. Les acides aminés les plus stables sont en bleu foncé, et ceux qui sont les plus flexibles sont en rouge.

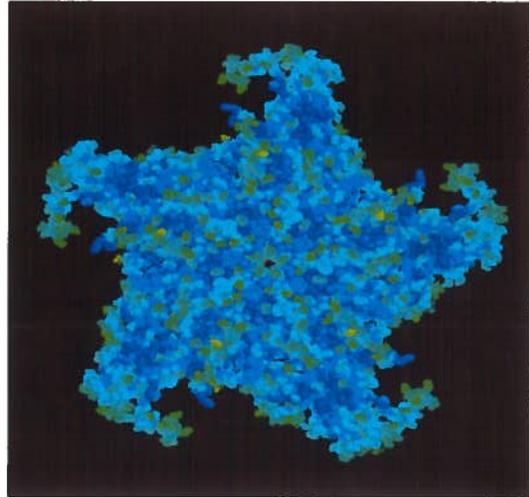
Les acides aminés les plus flexibles se positionnent du côté extérieur, surtout autour des axes de symétrie d'ordre 5. Les acides aminés en bleu foncé ont une grande stabilité et se retrouvent du côté intérieur de la capsid.

- A) Pentamère visionné du côté externe
- B) Pentamère visionné du côté interne
- C) Pentamère coupé et vue de travers
- D) Mise en évidence des résidus conservés de la VP2 (blanc) par rapport à leur stabilité

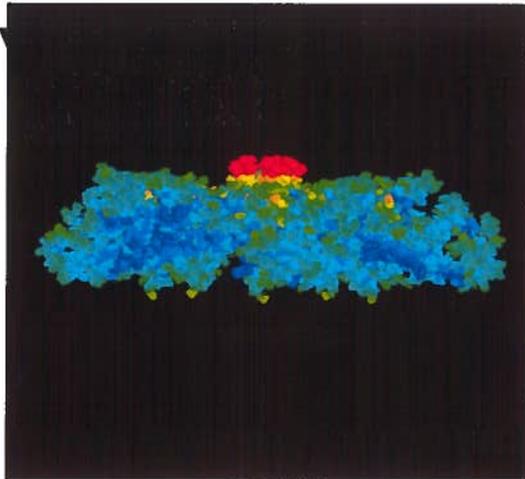
A. Vue extérieure



B. Vue intérieure



C. Vue de côté



D. Les résidus conservés de la



MÉTHODOLOGIE

1. Les gels

1.1 Gels d'agarose

Le gel d'agarose est utilisé pour séparer des fragments d'ADN par leur taille et d'estimer ces derniers en les comparant à une standard, un marqueur de 1kb. Les gels utilisés dans ce projet ont une concentration de 1.0%. La préparation du gel se fait par dissolution de 1.0 g d'agarose (Gibco BRL) dans 100 ml de TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA (acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique), pH 8.0, 0.114% [v/v] d'acide acétique glacial). Les échantillons d'ADN sont mélangés avec un volume de 1 à 5 avec le tampon de chargement 6x (0.25% [p/v] bleu de bromophénol, 0.25% [p/v] de xylene cyanol FF, 30% [v/v] de glycérol). Comme référence, 5µ l du marqueur d'ADN 1 kb de GibcoBRL a été utilisé. La migration du gel est d'environ une heure à 100 volts (bloc d'alimentation modèle 250/2.5 Bio-Rad) dans du tampon de TAE. La coloration se fait avec du bromure d'éthidium d'une concentration de 0.5 µg/ml pendant 15 minutes. L'ADN est révélé sous forme de bandes sur un trans-illuminateur ultra-violet (UV). Les photographies de gel sont prises sur film Polapan 667 de Polaroid.

1.2 Gels de polyacrylamide

Ce type de gel est utilisé pour la séparation des protéines par leur masse moléculaire. En premier lieu, la préparation du gel de séparation d'une concentration de 7.5% est obtenue en mélangeant :

- 1.0 ml de la solution stock 40 % d'acrylamide;
- 1.25 ml du tampon 4X Tris-Cl/SDS pH 8.8 (1.5 M Tris-HCl, 0.4% [p/v] dodecyl sulfate de sodium (SDS), pH 8.8);
- ajuster le volume à 5 ml avec de l'eau distillée;
- 50 µl d'une solution fraîche de persulfate d'ammonium 10% et de 5 µl de N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Bio-Rad), y sont ensuite ajoutés. Le gel est ensuite rapidement coulé dans un moule de l'appareil Mini-Protean II System de Bio-Rad

avec les dimensions de 0.75 mm x 80 mm x 75 mm. La hauteur doit être sous le peigne de puits. Le gel est alors immédiatement recouvert d'eau distillée afin d'obtenir une surface uniforme et ensuite il nécessite 30 minutes pour se polymériser.

Le gel d'entassement est d'une concentration de 5.0% et est préparé comme suit :

-312 μ l de la solution d'acrylamide 40%;

-625 μ l du tampon 4X Tris·Cl/SDS pH 6.8 (0.5 M Tris-HCl, 0.4% [p/v] SDS, pH6.8);

-ajuster le volume à 2.5 ml avec de l'eau distillée;

-50 μ l de persulfate d'ammonium 10% et 5 μ l de TEMED sont ajoutés. Le gel est ensuite coulé sur le gel de séparation polymérisé, et un peigne de 10 puits avec 5 mm de largeur est installé. Une autre attente de 30 minutes est nécessaire pour la polymérisation.

Les échantillons sont préparés en prenant :

-15 μ l d'échantillons;

-3 μ l du tampon de chargement 5X (0.063 M Tris·HCl, 10% glycérol [v/v], 2% SDS [p/v], 5% 2-mercaptoéthanol [v/v], 0.05% bromophénol bleu [p/v]);

Les échantillons sont placés dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, pour dénaturer les protéines. Ils sont par la suite chargés avec un marqueur de poids moléculaire (Broad Range, Bio-Rad) dans les puits du gel. Ce dernier est immergé dans le tampon d'électrophorèse/SDS (3% Tris-base [p/v], 14.4% glycine [p/v], 1% SDS [p/v]) et soumis à un courant de 200 volts pendant 60 minutes.

1.2.1 Transfert sur une membrane de nitrocellulose

Suite à la séparation des protéines par électrophorèse, ces dernières sont transférées du gel à une membrane de nitrocellulose. La membrane permet de donner un accès aux protéines pour la détection par des anticorps. Une membrane de nitrocellulose (0.2 μ m Bio-Rad) est coupée selon la même dimension que le gel de protéine et est trempée dans du tampon de transfert (10 mM acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique (CAPS), 10% méthanol [v/v], pH 11). L'appareil de transfert est de marque « The Panther TM », modèle HEP-1 de Owl Scientific. Un papier d'absorption 3MM CHR de Whatman est coupé en 6 morceaux de dimension égale à celle du gel. Trois d'entre eux sont imbibés

avec le tampon CAPS et placés sur la plaque de polarité négative de l'appareil, suivi du gel, de la membrane de nitrocellulose, et finalement, des trois autres papiers absorbants trempés. La plaque positive est vissée par dessus le tout. Le transfert, « semi-dry », est réalisé à un ampérage de 350 mA (Power supply, Power Pac 200, Bio-Rad) durant une période de 60 minutes.

1.2.2 Immunobuvardage de type Western

Suite au transfert sur la membrane de nitrocellulose, des anticorps primaires et secondaires sont utilisés pour détecter la présence des protéines. La membrane est trempée pendant une heure dans une solution de 5% lait [p/v] / TBST 1X (10 mM Tris [p/v], 150 mM NaCl [p/v], pH 8.0, 0.1% Tween [v/v]). La solution de lait est ensuite enlevée et le premier anticorps, l'anti-VP2 de lapin (1/1000), est ajouté pour une autre heure (les anticorps sont dilués dans la solution 5% lait / TBST 1X). La membrane est alors rincée trois fois avec du TBST 1X, chaque fois pendant 5 minutes. Suite au lavage, le deuxième anticorps, l'anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (1/2000), est appliqué pendant une heure, puis un autre lavage suit. Le dernier rinçage est fait avec du TBS 1X (10 mM Tris [p/v], 150 mM NaCl [p/v], pH 8.0). Pour la détection, la membrane est trempée dans le tampon de détection (tampon de phosphate : 100 mM Tris [p/v], 100 mM NaCl [p/v], 5 mM MgCl₂ [p/v], pH 9.2 à 9.5; solution de détection : NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium/bromo-chloro-indolyl phosphate) 150 µl, et est placée dans l'obscurité. La coloration de la membrane (où la présence de la VP2 est détectée par des bandes apparaissant de couleur mauve), est vérifiée toutes les 5 minutes. Une fois la coloration atteinte, la membrane est séchée puis conservée dans du papier aluminium.

2. Purification d'ADN

2.1 Mini-préparation rapide d'ADN (UFX)

Cette méthode est utilisée pour sélectionner rapidement les clones obtenus suite à une digestion de l'ADN par des enzymes de restriction.

Des colonies de bactérie cultivées provenant d'une transformation sontensemencées individuellement dans des tubes en verre de Fisher Scientific, contenant 2 ml de milieu LB (Luria-Bertani) avec de l'ampicilline (100 µg/ml). Les tubes sont incubés 16 heures à 30 °C avec une agitation de 200 rpm. Chaque culture est transférée dans un tube microtube de 1.5 ml pour microcentrifugation. Une centrifugation rapide conduit à la sédimentation des bactéries, et le surnageant est enlevé. 100 µl de la solution I (50 mM glucose [p/v], 25 mM Tris-HCl [p/v], 10 mM EDTA [p/v], autoclavé) sont ajoutés, puis les tubes sont mélangés au vortex pour que la solution soit homogène. Ensuite, on ajoute 200 µl de la solution II (0.2 N NaOH [v/v], 1% SDS [p/v]). Les tubes sont mélangés délicatement par inversion. La solution III (5 M d'acétate de potassium [p/v], 11.5% d'acide acétique glacial [v/v], pH 5.5) est ajoutée en dernier, soit 150 µl par tube. Encore une fois on mélange par inversion avant de placer les tubes sur glace pendant 5 minutes. Les tubes sont par la suite centrifugés pendant 5 minutes à une vitesse de 12 000 g. Les surnageants sont transférés dans de nouveaux tubes puis l'ADN est précipité avec 450 µl isopropanol 100%. Une autre centrifugation (12 000 g) de 3.5 minutes aboutit à l'accumulation de l'ADN en culot au fond des tubes. Le culot obtenu est lavé avec 1.0 ml d'éthanol 70% et une autre centrifugation (12 000 g) de 1 minute est effectuée. Le surnageant est enlevé, puis les tubes sont séchés pendant 10 minutes dans le Speed Vac. Les culots sont ensuite resuspendus dans 40 µl d'eau distillée qui contient 10 µg/ml de RNase A (Pharmacia Biotech). 5 µl d'ADN sera digéré par les enzymes de restrictions.

Pour la digestion, deux enzymes sont utilisées à chaque fois pour choisir les bons clones. Dans ce projet, les vecteurs utilisés contiennent deux sites de *PvuII* et un site de *EcoRI*. Ainsi, à la suite de la digestion, le profil des bandes d'ADN sur un gel d'agarose

permet de choisir les bons clônes. Premièrement, une solution stock contenant un volume total de 20 μl par échantillon est préparée. Pour 12 tubes, alors 240 μl est le volume total moins l'ADN ($5 \times 12 = 60 \mu\text{l}$), 24 μl du tampon de digestion #2 10X de New England Biolab (NEB) et 4 μl de chaque enzyme. Ainsi, 148 μl d'eau distillée est nécessaire pour compléter le volume total. La solution stock est divisée de manière égale dans 12 nouveaux tubes, soit 15 μl par tube. L'ADN est ensuite ajouté (5 μl). Le tout est mélangé et la digestion se fait à 37 °C pendant 45-60 minutes. Puis, le profil de digestion est vérifié sur gel d'agarose avec deux références, soit le marqueur d'ADN de 1 kb et le vecteur digéré. Les clônes positifs sont sélectionnés pour une meilleure purification par la méthode modifiée de « plasmid mini kit » de Qiagen Inc, en vue du séquençage.

2.2 Purification d'ADN plasmidique

Cette méthode est modifiée du protocole de Qiagen et conduit à l'obtention d'ADN pur nécessaire pour le séquençage. Toutes les solutions proviennent du kit, ainsi que les tubes filtres.

En premier lieu, la quantité de culture bactérienne est le double de celle de la mini préparation rapide, soit 2 tubes de 2 ml chacun. Les conditions de l'incubation sont les mêmes qu'auparavant. La culture est transférée dans des microtubes et centrifugée à deux reprises pour passer toute la culture. Le culot est mélangé par vortex, 300 μl la solution I froide sont ajoutés, puis un mélange par vortex est de nouveau performé. Un autre 300 μl de la solution II cette fois-ci, sont ajoutés et le mélange se fait par inversion. Suite à une attente de 5 minutes à la température de la pièce, l'ajout de 420 μl de la solution III suivi par le mélange par inversion de nouveau et ensuite les tubes sont placés sur glace pendant 5 minutes. Une centrifugation pendant 10 minutes à 12 000 g est suivie du transfert du surnageant dans des tubes filtres provenant de la trousse. Les étapes suivantes sont toutes suivies d'une centrifugation de 1 minute à 10 000g. Le premier lavage s'effectue avec 500 μl de tampon wash buffer I, et le deuxième avec 700 μl de tampon wash buffer II.

Ensuite, les tubes filtres sont transférés dans de nouveaux microtubes et l'ADN est élué avec 100 µl du tampon d'éluion.

2.2.1 Purification par phénol / chloroforme

Pour une meilleure purification, l'ADN est traité à nouveau avec une solution de phénol / chloroforme (1:1).

100 µl de cette solution sont ajoutés à l'ADN élué, les tubes sont mélangés par inversion puis centrifugés pendant 2 minutes à 12 000 g. La phase du haut est transférée dans des nouveaux tubes, puis 0.2 volume de 10M de NH₄Ac et 100 µl d'isopropanol 100% sont ajoutés pour précipiter l'ADN. Une attente de 5 minutes à température pièce est suivie d'une centrifugation de 6 minutes et l'élimination du surnageant. Le culot obtenu est lavé avec 700 µl d'éthanol 70%, puis, séché comme auparavant et enfin resuspendu dans 40 µl de 0.5X tampon Tris-EDTA (TE).

2.3 Séquençage

L'ADN purifié par cette méthode est séquencé. En premier, une réaction d'amplification par cycle thermique ou une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée :

- volume total de 20 µl
- 6 µl du tampon du colorant « Big Dye »
- 2 µl du colorant « big dye » (Applied Biosystems)
- 1 µl d'amorce
- 11 µl d'ADN [10 ng/µl]

Le tout est mélangé et placé dans la machine de PCR (Applied Biosystems) avec les conditions suivantes :

96°C pour 10 secondes (dénaturation)
 50°C pour 5 secondes (hybridation)
 60°C pour 4 minutes (élongation)
 pour 25 cycles

Plusieurs amorces ont été utilisées pour le projet selon la position de la mutation (voir tableau I).

Tableau I : Amorces utilisées pour le séquençage.

Amorces	Mutants	Composition de 5' à 3'	Région séquencée
PPV5S2	M1-M14	GGTGCTGGGGGGGTTGG	2925-3500 direction 5' à 3'
PR36	M15-M17	Référence : Zádori <i>et al.</i> , 2005	3680-3430 direction 3' à 5'
PPV5S8	M18-21	CTAACTCCTATAGTACCA ACAGC	3890-4400 direction 5' à 3'
PPV3AS5	M22-M26	TGCCACCAATATTTGTAG GAATATAGTTACC	4530-4220 direction 3' à 5'

À la fin de la réaction, l'ADN est transféré et précipité avec 1.6 µl de 10 M NH₄Ac et 50 µl d'éthanol. Après une attente d'une durée minimale de 20 minutes à température pièce, l'ADN est centrifugé à 12 000 g pendant 15 minutes. Le surnageant est enlevé, puis un lavage avec 250 µl d'éthanol 70% est effectué avec une centrifugation à la même vitesse pendant 5 minutes. Les échantillons sont séchés une heure à l'air, ensuite 25 µl de tampon de séquençage (Applied Biosystems) sont ajoutés et les échantillons sont à nouveau incubés 15 minutes. Le culot est décollé et la solution est transférée dans les tubes spécialement conçus pour le séquençage (Applied Biosystems). Les échantillons sont finalement placés dans le séquenceur automatique ABI Prism, 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer.

Le séquençage permet de déterminer, en premier lieu la présence de la mutation créée et en deuxième lieu l'absence d'autres mutations dans ce même vecteur. Le succès de la mutagenèse dirigée ainsi que la création des clones infectieux sont déterminés par le séquençage.

2.4 Midi-préparation d'ADN

Cette technique est utilisée pour purifier une grande quantité d'ADN qui sera nécessaire pour le clonage et la transfection des cellules. Un protocole modifié de Qiagen est élaboré, dans lequel tous les tampons proviennent du kit incluant les filtres (Qiagen-tip 100) :

- Pour commencer, 40 ml de culture bactérienne est incubée pendant 16 heures à 30°C avec une agitation de 200 rpm;
- La culture est transférée dans un tube de plastique stérile pour la centrifugeuse Sorvall, et placée sur glace;
- Le rotor SS34 est utilisé pour la centrifugation d'une durée de 5 minutes à une vitesse de 6 000 g;
- Le surnageant est enlevé, tandis que le culot est vortexé et resuspendu dans 4 ml du tampon P1 froid et vortexé de nouveau pour obtenir une solution homogène;
- 4 ml du tampon P2 sont ajoutés, la solution est ensuite mélangée par inversion puis gardée à 25°C pendant 5 minutes;
- Un autre 4 ml du tampon P3 froid sont ajoutés et la solution est placée sur glace pendant 15 minutes en mélangeant au 2 minutes par inversion;
- Le tube est de nouveau centrifugé mais cette fois pendant 10 minutes à 15 000 g;
- Le surnageant est placé dans le filtre Qiagen-tip 100 (qui a été préalablement équilibré avec 4 ml du tampon d'équilibration);
- Après le drainage par gravité, on lave deux fois avec 10 ml de tampon QC;
- Puis, l'élution est réalisée avec 5 ml du tampon d'élution dans un tube de 15 ml en plastique;

- Finalement, la précipitation et le lavage de l'ADN s'effectue comme auparavant, mais le volume varie, c'est-à-dire 3.5 ml d'isopropanol 100% et 1 ml d'éthanol 70% sont utilisés;
- Le culot est séché puis resuspendu dans 200 µl de TE 1X;

La concentration d'ADN est mesurée par spectrophomètre avec une absorption de 260nm. La concentration varie de 0.2 à 1 µg/µl.

3. Création des mutants

3.1 Les oligonucléotides des mutants

La construction des 26 mutants est réalisée par mutagenèse dirigée (alanine scan) avec des amorces contenant la mutation voulue (Tableau II). Le alanine scan est une technique simple et largement utilisée en recherche par cette technique les résidus choisis sont remplacés par un alanine (A). Comme A est un acide aminé de petite taille avec une charge neutre, son utilisation permet de déterminer le rôle fonctionnel et catalytique des résidus dans une protéine.

Les oligonucléotides d'une longueur de 30-45 nucléotides sont construits comportant la mutation au centre et sont composés de 40-50% de G ou C.

Exemple :



Et l'amorce avec la séquence inverse :



3.2 Mutagénèse Dirigée

Le protocole de QuickChange (Stratagene) est utilisé comme méthode de mutagénèse dirigée pour créer les mutants. Les réactions contiennent un volume total de 50 μ l:

- 5 μ l du tampon de réaction de la polymérase Pfu Turbo 10X (Roche Diagnostic);
- 1 μ l d'une mixture d'NTPs;
- 1 μ l de chacune des amorces avec une concentration de 10 pmol/ μ l;
- 41 μ l d'eau de PCR;
- 1 μ l du vecteur pBluescript II qui contient le gène de VP [pBK-VP2] (0.1 μ g/ μ l ou 0.02 μ g/ μ l);
- 1 μ l de la polymérase Pfu Turbo (Roche Diagnostic);

(Deux réactions ont été utilisées pour chaque mutation avec deux concentrations différentes du vecteur soit 0.1 μ g/ μ l pour une dilution 1X et 0.02 μ g/ μ l pour une dilution 5X). Les conditions de PCR du thermocycleur Touchdown Hybaid sont :

- étape 1 : 95°C pour 30 secondes
un seul cycle
- étape 2 : 95°C pour 30 secondes (dénaturation)
55°C pour 30 secondes (hybridation)
68°C pour 15 minutes (élongation)
15 cycles

Deux vecteurs de mutagénèse sont utilisés : le premier est le pBK-VP contenant le gène de la VP du PPV (Zádori *et al.*, 2001), le deuxième, pBK-VPX, est le vecteur pBK-VP modifié pour pouvoir cloner les mutants M22 à M26. Ces derniers mutants nécessitent un site d'une enzyme de restriction en aval pour transférer les mutations de ce vecteur au clone infectieux. Le site *Xho*I a été cloné à l'extrémité 3' du gène pour permettre le transfert.

Suite à la PCR, 5 μ l des échantillons sont déposés sur gel d'agarose pour visualiser l'ADN. Les deux réactions de chaque mutation sont ensuite combinées ensemble puis, le

tout est digéré avec *DpnI* 1 μ l (20 unités/ μ l) pour une durée d'une heure à 37°C. *DpnI* est utilisé pour éliminer les brins parentaux d'ADN en raison de sa capacité à couper l'ADN méthylé avec la séquence GA^M↓TC. L'ADN est ensuite purifié suivant les étapes énumérées plus haut dans lesquelles sont utilisés le NH₄Ac, l'isopropanol et l'éthanol. Le culot est resuspendu dans 10 μ l d'eau distillée.

Tableau II: L'énumération des résidus mutés effectués avec leurs amorces.

<u>Nom du clône</u>	<u>Mutations</u>	<u>Amorces</u>
M1	R68A	D 5' ---GCACACGCATCA G CACTCA---3' G 5' ---TGAGT G CTGATGCGTGTGC--- 3'
M2	P108A	D 5' ---CAAATGGTAACA G CTTGGT---3' G 5' ---ACCAA G CTGTTACCATTG--- 3'
M3	TPW107AAA	D 5' ---AAATGGTAG G CT G CT G CGT --- 3' G 5' ---AC G CAG G CAG G CTACCATT --- 3'
M4	N115A	D 5' ---GATGCT G CCGCATGGGGA --- 3' G 5' ---TCCCATGCG G CAGCATC --- 3'
M5	P123A	D 5' ---GGTCAAT G CAGCGGACT ---3' G 5' ---AGTCCGCT G CATTGAACC --- 3'
M6	T107A	D 5' ---CAAATGGTAG G CACCTTGG--- 3' G 5' ---CCAAGGT G CTACCATTG --- 3'
M7	W109A	D 5' ---TGGTAACACCT G CGTCAC--- 3' G 5' ---GTGAC G CAGGTGTTACCA--- 3'
M8	Q127A	D 5' ---CGGACTGG G CGTTAATAT--- 3' G 5' ---ATATTAAC G CCAGTCCG--- 3'
M9	K151A	D 5' ---GTACTT G CAACAATTACA ---3' G 5' ---TGTAATTGTT G CAAGTAC ---3'
M10	T170A	D 5' ---GATCTA G CTGCAAGCTTA--- 3' G 5' ---TAAGCTTGCA G CTAGATC--- 3'
M11	D178A	D 5' ---GCACTA G CCACCAATAAC---3' G 5' ---GTTATTGGT G CTAGTGC--- 3'
M12	P184A	D 5' ---CACACTT G CATACACACC---3' G 5' ---GGTGTGTAT G CAAGTGTG---3'
M13	F244A	D 5' ---CATTAT G CCCTACACAAT---3' G 5' ---ATTGTGTAG G CCATAATG---3'

Tableau II: L'énumération des résidus mutés effectués avec leurs amorces (suite).

<u>Nom du clône</u>	<u>Mutations</u>	<u>Amorces</u>
M14	E248A	D 5' ---CAATAG GC AAATGCAGTACC--- 3' G 5' ---GGTACTGCATTT GCT TATTG--- 3'
M15	T258A	D 5' ---CTAAGAG GC AGGAGATGAA--- 3' G 5' ---TTCATCTCCT GCT CCTTAG--- 3'
M16	G259A	D 5' ---AGAACA GC CAGAATGAATTC---3' G 5' ---GAATTCATTCT GCT TGTTCT---- 3'
M17	TG258AA	D 5' ---TAAGAG GCAGC AGATGAATTC---3' G 5' ---GAATTCATCT GCTGCT CCTTA--- 3'
M18	I465A	D 5' ---GGTCAA GC ATGGGATAAAG--- 3' G 5' ---CTTTATCCCAG GCT TGACC---- 3'
M19	W466A	D 5' ---GGTCAAATA GC GGATAAAG--- 3' G 5' ---CTTTATCC GCT TATTTGACC---- 3'
M20	IW465AA	D 5' ---TGGTCAA GCAGC GGATAAAG--- 3' G 5' ---CTTTATCC GCTGCT TGACCA---- 3'
M21	K468A	D 5' ---TATGGGAT GC CAGAACTTGAT--- 3' G 5' ---ATCAAGTTCT GC ATCCCATATA--- 3'
M22	P491A	D 5' ---CAATCCA GC AGGACA ACTATT--- 3' G 5' ---AATAGTTGTCCT GCT TGGATTG--- 3'
M23	W540A	D 5' ---ATATG GC GAACCCTATTCAAC--- 3' G 5' ---GTTGAATAGGGTT GCC CATAT--- 3'
M24	N541A	D 5' ---TATGTGG GCC CCTATTCAACA---3' G 5' ---TGTTGAATAGGG GCCC CACATA---3'
M25	P542A	D 5' ---TATGTGGAAC GCC TATTCAACA---3' G 5' ---TGTTGAATAG GCGT TCCACATA--- 3'
M26	WNP540AAA	D 5' ---TATG GCGGCCG CTATTCAACAA--- 3' G 5' ---TTGTTGAATAG GCGGCCGCC CATA--- 3'

3.3 Transformation des bactéries

L'ADN obtenu est utilisé pour transformer des bactéries compétentes XL1-Blue (Stratagene). 50 µl de bactérie décongelées et 1 µl d'ADN sont placés dans une cuvette stérile froide (BTX disponible cuvettes, 1mm). Le tout est bien mélangé puis placé dans l'électroporateur (BTX ECM 395 Electroporation System). Le mélange subit ensuite un choc de 1.8 kVolts pendant 5 millisecondes pour incorporer l'ADN du plasmide dans les bactéries. Le contenu de la cuvette est étalé sur une gélose LB-agar qui contient de l'ampicilline [100 µg/ml] et incubé à 37°C toute la nuit. L'antibiotique sélectionne les colonies qui ont incorporé l'ADN.

Trois ou quatre clones positifs sont purifiés par la méthode de purification d'un mini plasmide d'ADN (Qiagen Qiaprep miniprep handbook), suivie par une extraction par purification par phénol / chloroforme en préparation pour le séquençage. Par le séquençage, on détermine si la mutation est bien incorporée dans le vecteur.

3.3.1 Cellules compétentes

Une culture bactérienne (Sure II ou XL1-blue) est préparée avec 2 ml de LB, 4 µl de tétracycline (5 mg/ml), puis incubée pendant 16 heures à 30°C avec une agitation de 200 rpm.

Cette culture est ajoutée à 500 ml du médium SOB stérile se trouvant dans un flacon d'Erlenmeyer de 2 litres, et la solution est replacée dans l'incubateur à 30 °C avec une agitation de 200 rpm. Trois à quatre heures plus tard, la culture après avoir atteint une densité optique finale de 0.5, est placée sur glace pendant 15 minutes. Ensuite, la culture est divisée en deux tubes de plastique de 250 ml (Nalgene) et centrifugée pendant 5 minutes à 5 000 g, dans le rotor GSA de la centrifugeuse Sorvall. Le surnageant est enlevé et le culot est lavé avec 200 ml d'eau distillée stérile froide, puis centrifugé à nouveau. Cette étape est répétée deux fois. Finalement, le culot est resuspendu dans une

solution de 2 ml de glycérol 10% stérile. La solution obtenue est aliquotée dans des microtubes stérile de 1.5 ml, à raison de 105 µl par tube. Les cellules compétentes résultantes sont rapidement placées dans le congélateur à -70°C. 20 minutes plus tard, un tube est décongelé et deux transformations sont réalisées, soit une avec un plasmide et l'autre sans plasmide (témoin positif et négatif, respectivement) pour déterminer la compétence des bactéries.

3.4 Clonage dans le clône infectieux

Les mutations obtenues dans le vecteur du pBK-VP sont transférées dans le vecteur infectieux qui est pUC19/PPV. Deux vecteurs infectieux sont utilisés, le premier PN2Δ formé du vecteur pUC19 et le génome du PPV (souche NADL-2) (Zádori *et al.*, 2001); le deuxième est PN2ΔX qui diffère du premier par une insertion d'une petite séquence contenant un site *XhoI* à l'extrémité 3' du gène de la VP du PPV (le plasmide PN2Δ est digéré par l'enzyme *BstZ171* pour éliminer la région 3' non-traduite de NADL-2, puis un éditeur de liens de *XhoI* (CTCGAG) est lié à ce site d'Émoussé-extrémité).

En temps normal, le clonage est produit par la digestion avec deux enzymes et suivi par la ligation. Mais, le génome du PPV contient des structures épinglées à cheveux à ses extrémités et celles-ci pourraient bloquer l'accès à la séquence voulue. Ainsi, la méthode traditionnelle pour le clonage ne peut pas être utilisée. Pour contourner ce problème et améliorer les possibilités du transfert, la réaction PCR était utilisée. Les mutations sont amplifiées par une réaction de PCR en utilisant deux amorces en direction opposée. La réaction d'amplification est réalisée de la même façon que la mutagenèse dirigée, sauf que les amorces et le vecteur sont différents. Les amorces utilisées sont T7 (TAATACGACTCACTATAGGG) et PR36 pour les premières 17 mutations et le reste avec T3 (ATTAACCCTCACTAAAGGGA) et PPV5S2. Le vecteur est le pBK-VP ou pBK-VPX qui contient la mutation.

Les conditions de PCR étaient les suivantes :

- étape 1 95 °C pour 30 secondes
un cycle
- étape 2 95 °C pour 40 secondes
53 °C pour 30 secondes
72 °C pour 3 minutes
pour 35 cycles

Suite à la réaction de PCR, le produit d'amplification est digéré, ainsi que le vecteur du clône infectieux avec deux enzymes pendant deux heures à 37 °C : pour les mutants 1 à 17, PN2Δ est utilisé comme clône infectieux et *NheI* et *EcoRI* comme enzymes; pour les mutants 18 à 26, le vecteur est PN2ΔX, les enzymes sont *EcoRI* et *XhoI*. Puis l'ADN de chaque digestion est précipité.

La ligation est produite en incubant tout l'ADN de chaque mutant et 1/5 d'ADN du clône infectieux avec la ligase «quick ligase» (New England Biolabs) pendant 10-15 minutes à la température de la pièce. Ensuite l'ADN est précipité et utilisé pour transformer des bactéries Sure II (Stratagene) dans un milieu contenant de l'ampicilline. Les colonies obtenues comportent le plasmide mais pas nécessairement la mutation. Pour confirmer l'incorporation de la mutation, le séquençage est utilisé.

Sur un gel d'agarose, un marqueur d'ADN de 1kb et le vecteur infectieux (PN2Δ ou PN2ΔX, selon la mutation) sont utilisés comme références pour déterminer quel clône infectieux a incorporé la mutation. Les colonies qui contiennent un ADN avec la même masse moléculaire que la référence sont choisies pour le séquençage.

4. Culture cellulaire

4.1 Passage des cellules

La lignée cellulaire PT (Porcine Testis) a été utilisée pour ce projet. C'est un clône dérivé de la lignée cellulaire ST (ATCC, CRL-146) qui est très susceptible au PPV (non publié). La culture de ces cellules est effectuée dans des flacons en plastique (25, 75 ou 150 cm² de Corning) avec un milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » DMEM (Gibco BRL) contenant 1% [v/v] Pénicilline/Streptomycine (10 U/ μ l, Gibco BRL), 1% [v/v] L-Glutamine 200 mM (Gibco BRL), 1% [v/v] acides aminés essentiels MEM 10 mM (Gibco BRL), et 7% [v/v] sérum de veau fœtal inactivé (Gibco BRL). Les conditions de croissance normale de ces cellules sont une incubation à 37 °C avec 5% de CO₂.

Lorsque les cellules atteignent une confluence de 100%, le passage des cellules dans un flacon de 75 cm² est effectué comme suit :

- le milieu est enlevé;
- les cellules sont lavées avec 10 ml du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline, Invitrogen Canada);
- 2 ml de la solution de trypsine (0.01% [p/v] trypsine; 0.04% EDTA [p/v]) (Gibco) sont ajoutés puis enlevés après avoir passé la solution sur toute la surface de la paroi, seulement 100-200 μ l sont laissés;
- après 5 minutes d'attente, quelques tapes sur le flacon sont appliquées pour décoller toutes les cellules;
- 6 ml de milieu DMEM sont ajoutés pour resuspendre les cellules;
- 0.5 ml des cellules sont transférées dans un nouveau flacon de la même grandeur;
- 12 ml de milieu frais sont ajoutés au nouveau flacon et ce dernier est incubé à 37 °C avec 5% de CO₂;

Les cellules prennent deux à trois jours pour devenir de nouveau confluentes à 100%.

4.2 Transfection des cellules PT

Les clones infectieux contenant ou non les mutations sont introduits dans les cellules PT par transfection en utilisant le Polyéthylèneimine (PEI, Polysciences) (Boussif *et al.*, 1995) d'une masse moléculaire de 25000. Les cellules sontensemencées pendant 16 heures dans une plaque de 24 puits (Corning), contenant des lamelles rondes en verre (Fisher Scientific Canada). La confluence des cellules lors de la transfection est de 50-60%. La réaction de transfection contient 1 µg d'ADN et 2 µl de PEI (1 mg/ml) dans 100 µl de milieu DMEM sans sérum et sans antibiotiques. Le tout est mélangé et incubé pendant 15 minutes à la température de la pièce. Le milieu de culture des cellules est enlevé. La solution de transfection, et 200 µl de milieu sans sérum ni antibiotique, sont par la suite ajoutés aux cellules. La plaque est incubée à 37 °C avec 5% de CO₂ pendant 5 heures. Ensuite, le milieu est enlevé et 500 µl de milieu frais qui contient des antibiotiques et du sérum sont ajoutés et la plaque est incubée à nouveau. Les temps d'incubation sont de 24 ou 48 heures. Des cellules non-transfectées sont utilisées comme témoin négatif, et celles transfectées avec les clones infectieux PN2Δ et PN2ΔX comme témoins positifs. La transfection des 26 mutants est répétée au moins trois fois, dans les mêmes conditions. Suite à la transfection, les cellules sont fixées et préparées pour être observées par microscopie suivant la méthodologie d'immunofluorescence.

4.3 Immunofluorescence et microscopie confocale

Pour arrêter l'infection, le milieu des cellules est enlevé puis les cellules sont fixées avec 300 µl de [v/v] formaldéhyde 3% dans du tampon d'immunofluorescence IF (Bio-Rad Diagnostic Canada). La fixation prend une incubation minimale de 30 minutes à la température de la pièce, ensuite les cellules sont lavées deux fois avec 1 ml de PBS. Ensuite 300 µl de [v/v] Triton X-100 3% dans du tampon IF sont ajoutés pour enlever les traces de formaldéhyde restante, suivi d'une incubation de 15 minutes et un deuxième lavage. Les anticorps primaires et secondaires (section 4.4) sont dilués dans du tampon IF, et 150 µl du mélange des anticorps primaires sont appliqués sur les cellules pendant

une heure de temps. Les cellules sont lavées comme auparavant et les anticorps secondaires sont appliqués pour une autre heure. Un autre lavage suit, puis les lamelles rondes sont montées sur des lamelles de microscope rectangulaires de dimensions 25 X 75 X 1 mm (Fisher Scientific Canada). Chaque rondelle est fixée sur la lamelle avec une goutte de gel « geltol mounting medium » (Immunon Thermo) [6 rondelles par lamelle]. Ensuite, on laisse sécher les lamelles pour finalement les analyser à l'aide d'un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800, EP1-fluorescent (UV) avec une magnitude de 100X ou 200X, et une longueur d'onde du bloc B-2A avec une émission de 450-490 nm et de 568 nm.

Les mêmes lamelles furent visionnées en microscope confocale (Bio-Radiance 2000), émercées d'huile version numérique 1.4, avec une magnitude de 400X. Les photos des cellules sont prises, analysées et groupées selon les différents phénotypes obtenus.

4.4 Les anticorps

Deux types d'anticorps primaires sont utilisés. Le premier est un anticorps monoclonal issu du surnageant de culture de l'hybridome de souris 3C9-D11-H11 (ATCC, CRL-1745) qui reconnaît la forme des capsides du PPV. Pour son utilisation en IF, le 3C9-D11-H11 est dilué 1/60 avec le tampon IF.

Le deuxième anticorps primaire est l'anti-VP2 (Pacific Immunology Corp., California), un anticorps polyclonal de lapin reconnaissant la région N-terminale de la VP2, ainsi que les capsides pleines du PPV. La région N-terminale de la VP2 est seulement externalisée quand le génome viral est incorporé dans la capside. Ainsi pour une capside vide, la région N-terminale de VP2 n'est pas accessible à l'anticorps. La dilution de l'anti-VP2 est de 1/2000 avec le tampon IF.

Ainsi, deux marqueurs secondaires sont utilisés soit l'Alexa Fluor 488 qui était couplé à l'anticorps anti-IgG de lapin (Invitrogen), pour détecter l'anticorps polyclonal

anti-VP2. Et l'Alexa fluor 568 couplé à l'anticorps anti-IgG de souris (Invitrogen), afin de détecter l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11. Ces deux anticorps secondaires proviennent de chèvre et sont dilués 1/2000 fois avec le tampon IF avant leur utilisation.

5. Production virale des mutants formant des capsides

Huit flacons de 150 cm² ont étéensemencés avec des cellules PT. À une confluence de plus ou moins 50%, les cellules sont transfectées avec les mutants qui forment des capsides virales, soit M10, M15, M16 et M17. Deux flacons par mutant sont utilisés. La méthodologie de la transfection est décrite plus haut, mais avec un volume de réactifs différent. La transfection a été répétée deux fois, la première pour une durée de deux semaines et l'autre pour 48 heures. Pour une transfection de deux semaines, on devrait détecter une plus grande production de virus.

5.1 Purification virale

La paroi des flacons est frottée pour détacher les cellules restantes. Ensuite les surnageants contenant les débris cellulaires et les virus sont placés dans des tubes en plastiques stériles et centrifugés pendant 30 minutes à 15 000 g. Les culots sont récupérés et resuspendus dans un volume maximal de 1 ml contenant 50 mM de Tris [p/v] (pH 8.5) et 10 mM MgCl₂ [p/v]. Une digestion de 4 heures à 37 °C avec 250 µl de trypsine est effectuée, suivie d'une autre digestion avec 200 unités de DNases [10 U/µl] pendant une heure à 37 °C. Encore une fois, 25 µl de trypsine sont ajoutés pour une digestion d'une heure. Après la digestion, 700 µl de chloroforme sont ajoutés. Le tout est mélangé et centrifugé à une vitesse maximale de 13 000 g. Le surnageant est transféré dans un filtre Microcon de YM-100 (100 000 mw) (Micon Bioseparation, Millipore Corporation), et centrifugé à une vitesse maximale. Le filtre est lavé deux fois avec 200 µl de 50 mM Tris pH 8.5, puis renversé dans un nouveau tube et finalement, centrifugé pour collecter le

virus. 50 μ l de virus sont recueillis et dilués avec 50 μ l de 50 mM Tris, pour un volume total de 100 μ l.

5.2 Détermination de l'infectivité des mutants formant des capsides

Pour déterminer si les mutants qui forment des capsides virales sont infectieux, des cellules sont transfectées avec ces mutants comme auparavant. Ensuite, le surnageant est enlevé et placé sur des cellules fraîches pour une infection de 48 heures (premier passage). Puis les cellules sont fixées et préparées pour l'IF.

5.3 Titrage des mutants formant des capsides virales (C⁺)

Le titrage permet de quantifier l'infectivité des mutants C⁺. Deux plaques de 96 puits, une pour chaque préparation de virus mutants, sontensemencées de cellules et incubées pendant 16 heures. Encore une fois, la confluence des cellules lors de l'infection est de 50-60%. Des dilutions en série (10^{-2} à 10^{-5}) des virus mutants sont préparées dans du milieu DMEM complet, puis sont utilisés pour infecter les cellules PT. Les puits de la plaque sont vidés du milieu, puis les dilutions sont ajoutées (trois puits pour chaque dilution). Pour le reste des puits, les cellules ne sont pas infectées et sont utilisées comme témoin négatif. La plaque est incubée en condition de croissance normale pendant 48 heures. Ensuite, les cellules sont fixées et préparées pour l'IF. En microscopie, on choisit pour chaque échantillon les puits dont la dilution donne entre 20 et 100 cellules positives. Le titre est déterminé par le nombre de foyers fluorescents par ml (FFU = fluorescent foci unit/ml).

Titrage : $\frac{\# \text{ de foyers positives}}{\text{Volume de virus} \times \text{dilution}}$.

5.4 Quantification des génomes viraux

La technique de PCR quantitatif « MIMIC » permet de déterminer le nombre de copies génomiques et est produite selon la procédure de Clontech.

Le PCR MIMIC est une méthode utilisée pour amplifier avec une paire d'amorces un standard interne et une séquence cible d'ADN. La séquence du standard interne est préparée en utilisant un fragment d'ADN non-homologue lié à des amorces spécifiques à l'amplification de l'ADN cible de sorte que sa longueur diffère de l'amplicon de l'ADN cible et contenant les séquences nécessaires pour la reconnaissance des amorces. Ce standard interne est utilisé comme standard pour la quantification du génome cible.

Le PCR quantitatif est produit par des réactions d'amplification en utilisant une série de dilutions du standard interne d'ADN (MIMIC) avec une quantité constante du cible d'ADN. Les deux séquences vont compétitionner pour les mêmes amorces pendant l'amplification. En connaissant la concentration du MIMIC, l'ADN de la séquence cible peut être déterminé. Ainsi, ceci est déterminé par la comparaison de nombre de copies génomiques par régression logarithmique, plus explicitement, le logarithme de l'intensité des produits d'amplification du génome cible sur l'intensité du MIMIC en fonction du logarithme des molécules MIMIC présentes. Quand le rapport logarithmique du MIMIC et l'amplicon cible est égale à 0, la quantité du génome cible est égale à la quantité des molécules MIMIC. Les génomes viraux des préparations I et II furent quantifiés par cette technique.

5.5 Production des figures de protéines

Pour créer les figures des protéines en 3 dimensions (3D), deux site-webs sont requis. Le premier, Virus Particle Explorer (VIPER) (Reddy *et al.*, 2001), permet de générer les oligomères, et le deuxième Protein Explorer permet d'analyser et de visualiser la structure en 3D.

Les points de coordination de la structure d'une protéine sont déposés dans la banque de protéine, Protein Data Base (PDB). Le numéro PDB de la protéine de structure du PPV est le 1k3V. Les axes de symétrie icosaédrale sont toujours orientés différemment que le système de coordination orthogonale. Le site-web pour VIPER est le : <http://mmtsb.scripps.edu/viper/> et permet de convertir les coordinations de PDB en orthogonale. Pour décrire les axes de symétrie d'une capsidale icosaédrale par rapport aux coordinations orthogonales, deux types de conventions sont utilisées soit : $z(2)-3-5-x(2)$ et $z(2)-3-5-y(2)$. Les chiffres 2, 3 et 5 correspondent aux trois axes de symétries et x, y, z sont leurs axes de coordinations orthogonales respectifs. Le système VIPER enregistre toutes ses données via la convention $z(2)-3-5-x(2)$.

Plusieurs structures capsidales sont présentées dans ce site et sont listées en ordre alphabétique et classifiées sous forme de T. Ce site est un générateur d'oligomères qui soumet les coordinations de la structure d'un oligomère choisi ou même la structure complète d'une capsidale. De plus, plusieurs autres outils sont présents pour faciliter l'utilisation de ce site tels que l'engin recherche, l'aide et les questions le plus souvent demandées. Suite à l'obtention d'oligomères, ces derniers peuvent être visualisés par, par exemple, Protein Explorer en 3D.

Le programme Protein Explorer se trouve au sit-web www.proteinexplorer.org. Ce programme permet entre autres l'analyse des séquences d'acides aminés et de nucléotides ainsi que la localisation de résidus dans une structure. La structure de la protéine peut être visualisées avec plusieurs couleurs et de plusieurs façons (structure secondaire, distributions hydrophobique vs hydrophilique, interactions non-covalente, etc...) pour faciliter l'analyse de ces paramètres. Ce programme a permis de visualiser l'emplacement des résidus choisis pour mutagénèse par rapport à la structure de la protéine sous sa forme monomérique et oligomérique.

RÉSULTATS

1. Les résidus conservés de VP2

Les séquences de la VP2 de plusieurs parvovirus sont alignées (figure 6) et comparées. Les régions conservées sont déterminées par cet alignement, régions griffonnées et certains acides aminés parmi les plus conservés (22 résidus) sont ensuite choisis, listés dans la partie bas de cet alignement. En plus, quatre mutations ont été créées dont quelques-unes contenant 2 ou 3 acides aminés avoisinants. La figure 7a montre la séquence de la VP2 où les acides aminés choisis sont représentés en rouge, tandis que sur la structure secondaire de la VP2 (figure 7 b), ces acides aminés sont représentés par des globules blancs dans la structure secondaire de la VP2. La mutagenèse dirigée par «alanine scan » a permis d'effectuer les mutations voulues (tableau II).

Le vecteur du clone infectieux contient tout le génome du PPV et, à ses deux extrémités, des structures à épingle à cheveux. Des mutations non-désirées pourraient survenir si ce vecteur est utilisé pour la mutagenèse. Par conséquent, le vecteur pBK-VP où seul le gène VP du PPV se trouve, est utilisé pour la mutagenèse. Ensuite le transfert au clone infectieux est produit.

La méthode de clonage généralement utilisée, la digestion avec des enzymes de restriction suivie d'une ligation avec la ligase T4, n'a pas permis l'obtention des clones voulus. Alors, la réaction PCR est utilisée pour contourner ce problème et pour l'obtention de ces clones.

Les mutations sont transférées du vecteur pBK-VP ou pBK-VPX au clone infectieux PN2 Δ ou PN2 Δ X. Encore une fois, l'incorporation a été confirmée par séquençage. À ce stade, les mutants sont prêts pour la transfection des cellules PT.

Figure 6 : Alignement de la VP2 de plusieurs parvovirus.

Un alignement de la séquence de la VP2 de plusieurs parvovirus a permis l'identification des régions conservées à travers ces espèces. Les régions conservées sont représentées par un gradient de couleur gris, le gris foncé représente les acides aminés (aa) les plus conservés. Les aa choisis sont listés au bas de chaque alignement.

		70	109	119	129	144	154					
Porcine	:	-itahas	li-ahtqmv	tpwslid	anawgvw	fnpad	qlisnm	-sfeqeif	vvlktite	: 58		
feline	:	-itanss	rlv-thvqiv	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqlivtm	-sfeqeif	vvlktvse	: 58		
MVM	:	-italatr	lv-ahqiqw	tpwslv	danawgvw	lqpsd	wqyictm	-sldqeif	vvlktvte	: 58		
CanineN	:	-itanss	rlv-ihaqiv	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqlivtm	-sfeqeif	vvlktvse	: 58		
H1	:	-itahas	lll-thqqiw	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqfiqsm	-slsqelf	vvlktvte	: 58		
Mink	:	-itanss	rlv-thvqiv	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqlivtm	-sfeqeif	vvlktvse	: 58		
mouse1	:	-itanss	rlv-thvqiv	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqlivtm	-sfeqeif	vvlktvse	: 58		
Aleuti	:	-itchatr	mv-fhqqvm	tpwyiv	dsnawgvw	mspkd	fqqmktlc	-tleqeiv	vtiktvte	: 58		
LuIII	:	-itayst	hmv-ahqiqw	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqyisnm	-sldqelf	vvlktvte	: 58		
chipmunk	:	-vtcfm	trc-tvmgyt	tpwhyv	dymmal	ffsp	qefylleny	-slttvls	dlvkdysi	: 58		
Killham	:	-itanas	lll-theqiw	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqfiqsm	-sfsqelf	vvlktvte	: 58		
Raccoon	:	-itanss	rlv-thvqiv	tpwslv	danawgvw	fnpgd	wqlivtm	-sfeqeif	vvlktvse	: 58		
bovine	:	-vvtkn	trqf-rqyait	tpwsyf	fnfnqyss	shsp	ndwqhlv	ndy-amivrvy	lqikqimt	: 58		
B19	:	-vtctfs	trqf-pimgys	tpwryl	dfnalnlf	sp	lefqlli	eny-altvtise	iavkdvtd	: 58		
Simian	:	-vtctfs	rvf-pvmayat	tpwhyv	dvncasly	sp	lefqlli	eny-smstvl	sevcikdvtd	: 58		
Mduck	:	-vitktr	tw-qyagys	tpwgyf	dfnr	fhchf	sprdw	qrli	nh-alkfkif	vqvkevtt	: 58	
goose	:	-vitktr	tw-qyagys	tpwgyf	dfnr	fhchf	sprdw	qrli	nh-slkkfkif	vqvkevtt	: 58	
AAV2	:	-vittst	trtw-hyfgys	tpwgyf	dfnr	fhchf	sprdw	qrli	nn-rlnfklf	iqvkevtt	: 58	
AAV3B	:	-vittst	trtw-hyfgys	tpwgyf	dfnr	fhchf	sprdw	qrli	nn-klfklf	iqvkevtt	: 58	
AAV4	:	-vtttst	trtw-tyngfs	tpwgyf	dfnr	fhchf	sprdw	qrli	nn-amrvkif	iqvkevtt	: 58	
AAV5	:	-vvtkst	trtw-ayfgys	tpwgyf	dfnr	fhshw	sprdw	qrli	ny-slrvkif	iqvkevtt	: 58	
AAV6	:	-vittst	trtw-hyfgys	tpwgyf	dfnr	fhchf	sprdw	qrli	nn-rlnfklf	iqvkevtt	: 58	
			R	TPW	N	P	Q		K			
										<= aa conservés		
		169	179	189	248	258	462					
Porcine	:	sat-yn	dltaslmv	-lctnnt	lpytpa	prsm	mytlien	nav-ihl	lrrtgde	fst-fp	ngq : 114	
feline	:	sat-yn	dltaslmv	-lctnnt	mpftpa	amrs	qfytiensv	vhl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
MVM	:	qds-yn	dltacmmv	-vctsn	nilpytpa	ansm	qftientq	itl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
CanineN	:	sat-yn	dltaslmv	-lctnnt	mpftpa	amrs	qfytiensv	vhl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
H1	:	qgg-yn	dltacmmv	-lctnnt	lpytpa	aqts	qftientl	itl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
Mink	:	sat-yn	dltaslmv	-lctnnt	mpftpa	amrs	qfytiensv	vhl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
mouse1	:	sat-yn	dltaslmv	-lctnnt	mpftpa	amrs	qfytiensv	vhl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
Aleuti	:	tnq-fn	dltaslqv	-lctnnt	lpytpa	aplg	nftieni	ni	lrrtgde	ant	ypwq : 114	
LuIII	:	qnt-yn	dltaammv	-lctnnt	lpytpa	idnq	qftientq	inl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
chipmunk	:	qdg-vtd	sgtggvai	-adesy	typyvl	gngqr	dffleham	fkiyk	qdf	vs-hyesq	: 114	
Killham	:	qdi-yn	dltacmmv	-lctnnt	lpytpa	aqts	qftientv	itl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
Raccoon	:	sat-yn	dltaslmv	-lctnnt	mpftpa	amrs	qfytiensv	vhl	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
bovine	:	dga-yn	dtagmhi	-cagdh	rypyv	qhpwdd	plymlensd	hev	lnd	griyri-srynp	: 114	
B19	:	ktg-vtd	sttgrlcm	-vdey	qpyvl	gngqd	ayvleh	hss-fql	g	eggasm-hyesq	: 114	
Simian	:	kpg-vtd	sttggklcf	-vdey	qpyvl	gngqd	ayvleh	han-cll	g	gssist-lmvs	: 114	
Mduck	:	qdg-ia	ntstiqi	-tdeh	qlpyvl	gsate	aycleyfp	sqm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
goose	:	qdg-ia	ntstiqv	-tdeh	qlpyvl	gsate	aycleyfp	sqm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
AAV2	:	ndg-ia	ntstvqv	-tdey	qlpyvl	gsahq	aycleyfp	sqm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
AAV3B	:	ndg-ia	ntstvqv	-tdey	qlpyvl	gsahq	aycleyfp	sqm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
AAV4	:	sng-va	ntstvqi	-adssy	elpyv	mdagge	aycleyfp	sqm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
AAV5	:	qds-ia	ntstvqv	-tdddy	qlpyv	ngte	sfcl	eyfp	skm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114
AAV6	:	ndg-ia	ntstvqv	-tdey	qlpyvl	gsahq	aycleyfp	sqm	lrrtgde	fat-yp	ngq : 114	
			T	D	P	F	E		TG			
										<= aa conservés		

Figure 7 : Les acides aminés conservés à travers les parvovirus.

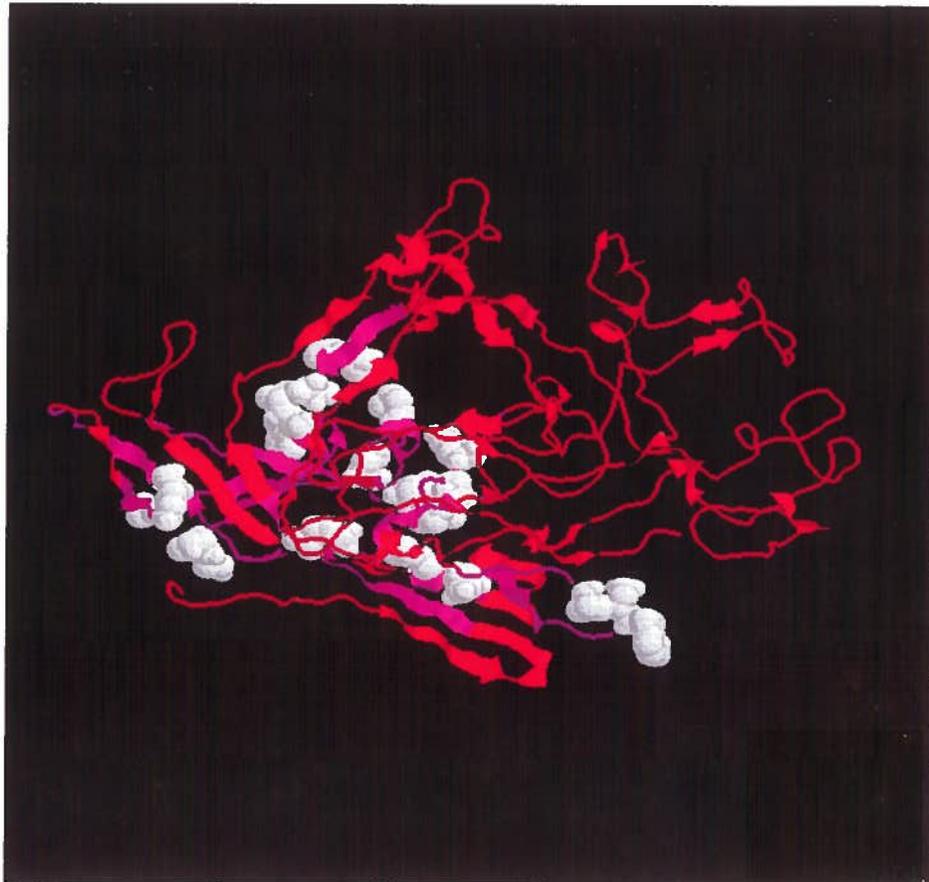
- A) Séquence protéolytique de la protéine VP2 du PPV ; les résidus conservés sont mis en évidence en rouge.

- B) Structure secondaire en ruban de la VP2. Le polypeptide est représenté en rouge avec ses régions conservées mises en évidences en mauve et les acides aminés choisis sont représentés par des globules blancs.

A

```
1  MSENVEQHNP  INAAATELSAT  GNESGGGGGG  GGGRGAGGVG  VSTGSFNNQT
51  EFQYLGEGLV  RITAHASRLI  HLNMPHEHET  KRIHVLNSES  GSAGQMVQDD
101 AHTQMVTPWS  LIDANAWGVW  FNPADWQLIS  NNMTEINLVS  FEQAI FNVVL
151  KTITESATSP  PTKIYNNDLT  ASLMVALDTN  NTLPYTPAAP  RSETLGFYPW
201  LPTKPTQYRY  YLSCIRNLNP  PTYTGQSQPN  NRLNTNRLHS  DIMFYTIENA
251  VPIHLLRTGD  EFSTGIYHFD  TKPLKLTHSW  QTNRSLGLPP  KLLTEPTTEG
301  DQHPGTLPA  NTRKGYHQTI  NNSYTEATAI  RPAQVGYNTP  YMFYEYSNGG
351  PFLTPIVPTA  DTQYNDDEPN  GAIRFTMDYQ  HGHLTTSSQE  LERYTFNPQS
401  KCGRAPKQQF  NQQAPLNLEN  TNGTLLPSD  PIGGKSNMHF  MNTLN TYGPL
451  TALNNTAPVF  PNGQIWDKEL  DTDLKPRLHV  TAPFVCKNPN  PGQLFVKIAP
501  NLTDDFNADS  PQQPRIITYS  NFWWKGT LTF  TAKMRSSNMW  NPIQQHTTTA
551  ENIGKYIPTN  IGGIKMFPEY  SQLIPRKLY*
```

B



2. Transfections des cellules PT et phénotypes des clônes

Les cellules PT sont transfectées avec les mutants. Des cellules non-transfectées sont utilisées comme témoins négatifs et les témoins positifs sont des cellules transfectées avec les deux clônes infectieux (sans mutation). Les cellules transfectées sont fixées et préparées pour déterminer le ou les phénotypes de la transfection virale des mutants. Les résultats de l'IF sont observés par microscopie confocale. Les deux anticorps utilisés en IF sont : le 3C9-D11-H11, un anticorps monoclonal provenant de souris qui reconnaît la capsid virale et tout au long du projet, il est détecté par un anticorps secondaire anti-IgG de souris, provenant de chèvre, marqué à l'Alexa fluor 568. L'anti-VP2 provenant de lapin, un anticorps polyclonal, permet de reconnaître la présence de la protéine VP2. Cet anticorps reconnaît une partie N-terminale de la VP2 et il est détecté par un anticorps secondaire anti-IgG de lapin, provenant de chèvre, marqué à l'Alexa fluor 488. Ainsi en microscopie, la capsid est observée en rouge et la protéine VP2 en vert. La superposition des deux anticorps (rouge et vert) résulte à la couleur jaune là où la position de la capsid et la VP2 est la même.

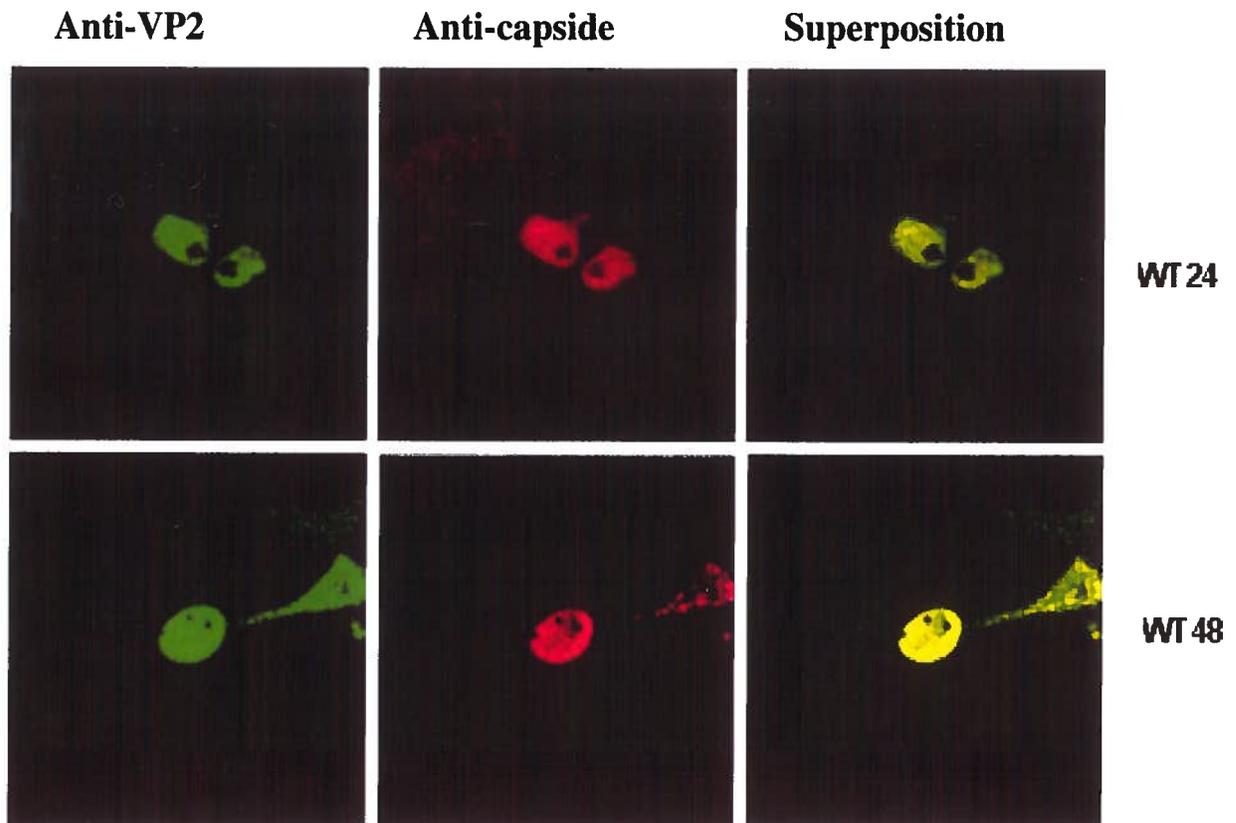
Pour chaque transfection produite, les clônes infectieux étaient utilisés comme témoin positif et des cellules non-transfectées servent comme témoin négatif. La figure 8 démontre le phénotype des clônes infectieux dans une cellule où la présence de la VP2 en vert (colonne de gauche) et de la capsid en rouge (colonne du centre) sont observées. Les deux se trouvent superposer dans le noyau de la cellule en jaune (colonne de droite). Deux temps ont été choisis pour les transfections, soit 24 et 48 heures. À 24 heures, il y a une observation de la production virale mais une plus grande production virale est observée à 48 heures. La figure 8, le phénotype des témoins positifs est représenté pour 24 et 48 heures. Pour tous les mutants créés, les photos utilisées pour montrer les phénotypes de ces derniers, sont ceux suite à une transfection de 48 heures. Car une plus grande production virale existe après 48 heures de transfection. Pour les cellules non-transfectées aucune cellule positive est visible (pas montré).

Figure 8 : Observation en microscopie et phénotype des cellules PT transfectées avec les témoins positifs PN2 Δ et PN2 Δ X lors des infections de 24 et 48 heures.

Exemples de cellules transfectées par le clone infectieux sans mutations.

WT24 représente le clone infectieux PN2 Δ transfecté dans les cellules pour une durée de 24 heures et WT48 le PN2 Δ X, pour une transfection de 48 heures.

L'anti-VP2 est identifié par l'Alexa Fluor 488 de lapin en vert et l'anti-capside (3C9-D11-H11) est identifié par l'Alexa Fluor 568 de souris en rouge. La superposition des deux anticorps apparaissant en jaune. Les photos sont observées et prises par un microscope confocal à un grossissement de 400X.



L'observation des mutants par IF a montrée que tous les mutants contiennent des cellules positives pour la VP2 (figures 9, 10, 11 et 12), mais seulement quatre mutants étaient positifs pour la capsid (figure 12). Suite à cette observation, les phénotypes des mutants obtenus sont classés en deux groupes majeurs. Le premier groupe contient les mutants qui ne forment pas de capsides virales (C^-), et le deuxième regroupe les mutants qui produisent des capsides (C^+) (tableau III).

Le premier groupe (C^-) est subdivisé en trois sous-groupes selon la répartition de la protéine VP2 dans la cellule (tableau III). Toutes les figures de ce groupe représentent la superposition des deux anticorps suite à une transfection de 48 heures. Pour le sous-groupe C^- cytoplasmique, quatre exemples des sept membres montrent la présence de la VP2, en vert, exclusivement dans le cytoplasme (figure 9). La figure 10 montre trois exemples des trois mutants appartenant au sous-groupe C^- nucléaire, ici, la VP2 se trouve majoritairement dans le noyau. La répartition de la VP2 dans les deux compartiments est observée pour 12 mutants faisant parti du sous-groupe C^- cytoplasmique et nucléaire. Dans la figure 11 quatre exemples sont choisis pour montrer leur phénotype. Les phénotypes du groupe C^- montrent que même après une transfection de 48 heures, aucune capsid est observée.

La représentation des phénotypes du groupe C^+ est observée dans la figure 12 suite à une transfection de 48 heures. La colonne de gauche montre la présence de VP2, celle du centre la présence de la capsid et pour la colonne de droite la superposition des deux. Les quatre mutants appartenant à ce groupe forment des capsides virales, observées par la couleur rouge. À noter que pour le mutant G259A, une grande partie de VP2 restait dans le cytoplasme comparativement au témoin positif. Pour le mutant TG258AA, les capsides observées dans le noyau sont représentées en rouge même dans la figure de superposition (jaune pour le témoin positif). Comme déjà mentionner auparavant, l'anti-VP2 reconnaît une capsid pleine car le N-terminale de la VP2 est exposée. Mais il ne reconnaît pas une capsid vide parce que le N-terminale reste à l'intérieur de la capsid.

Tableau III : Classification des mutations selon le phénotype de production de capside virale

A) Les phénotypes, observés par IF, divisent les mutants en deux groupes majeurs : les mutants qui forment des capsides virales C^+ , et ceux qui ne forment pas de capsides C^- . Ce dernier est subdivisé en trois sous-groupes selon la répartition de la protéine VP2 dans les cellules.

<u><i>Mutants sans capsides</i></u> <u><i>(C⁻)</i></u>	<u><i>Mutants avec capsides</i></u> <u><i>(C⁺)</i></u>
VP2 cytoplasmique	
P108A; N115A W109A; I465A W466A; IW465AA P491A	
VP2 nucléaire	
P123A; Q127A W540A	
VP2 cytoplasmique et nucléaire	
R68A; TPW107AAA T107A; K151A; D178A P184A; F244A; E248A K468A; N541A; P542A WNP540AAA	
	T170A
	T258A
	G259A
	TG258AA

Figure 9 : Phénotype des cellules PT transfectées par des mutants du groupe C cytoplasmique.

Exemple de quatre mutants où la VP2 se retrouve dans le cytoplasme.

Les anticorps utilisés permettent de détecter la VP2 en vert et la capside en rouge. Les photos sont une superposition des deux anticorps (jaune). La capside n'étant pas présente, par conséquent, la couleur rouge n'est pas observée et seule VP2 (vert) apparait. Magnitude de 400X.

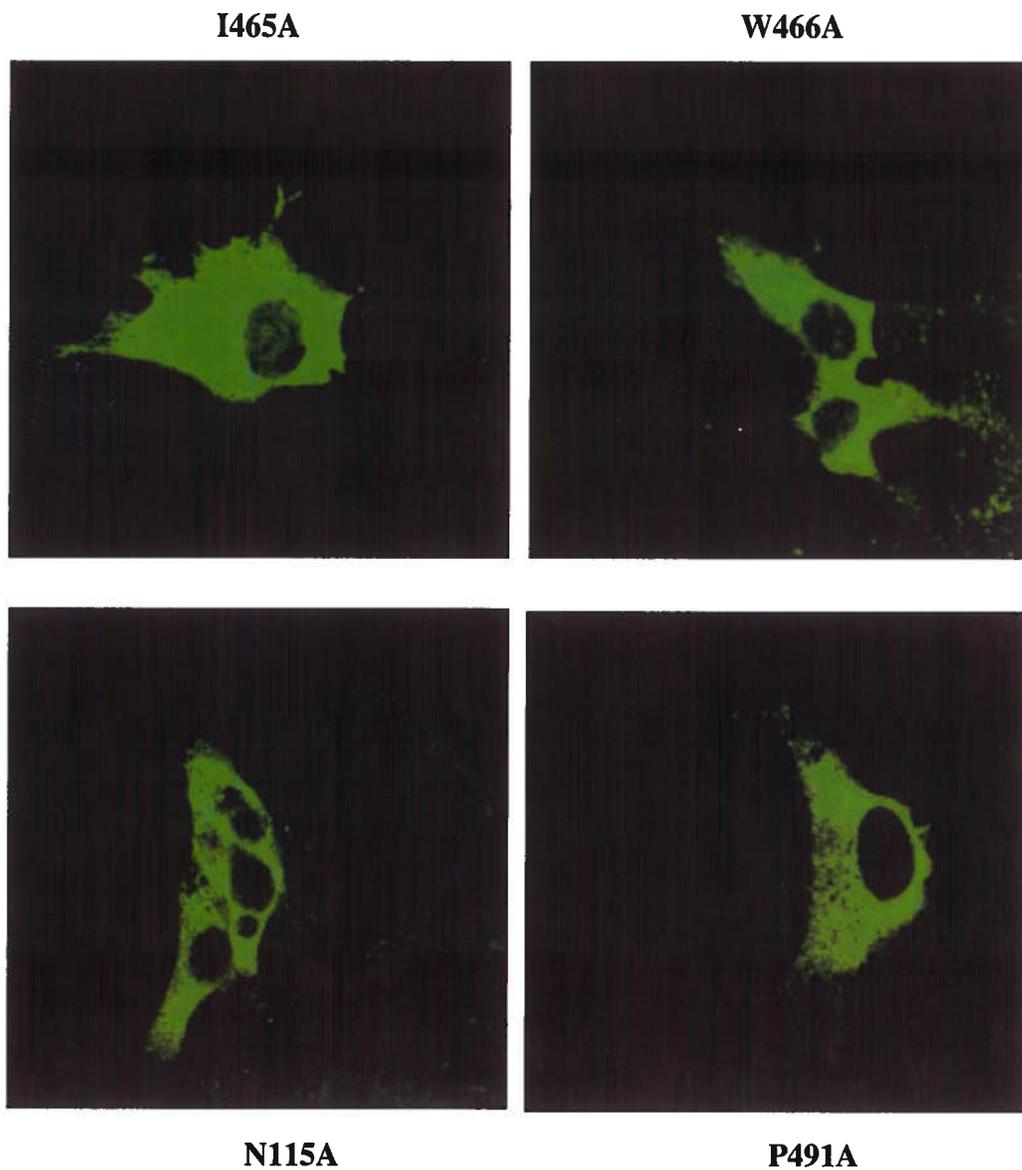


Figure 10 : Phénotype des cellules PT transfectées avec les mutants du groupe C nucléaire.

Exemple de trois mutants dont la VP2 se retrouve au noyau.

Comme auparavant, la même combinaison d'anticorps est utilisée, et les photos représentent la superposition des deux anticorps.

Encore une fois, les photos montrent la présence de VP2 et l'absence de capside.

Magnitude de 400X.

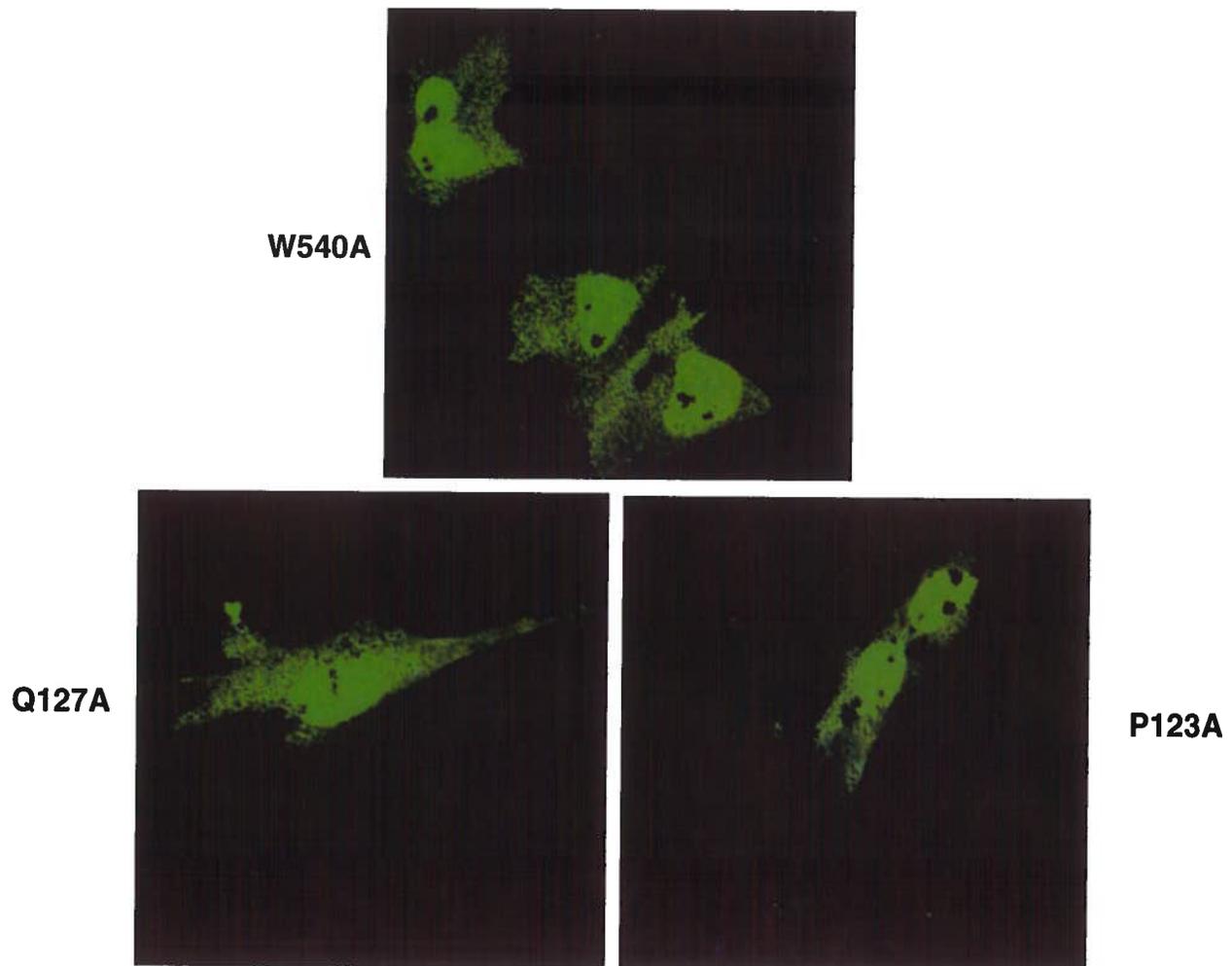


Figure 11 : Phénotype des cellules PT transfectées par le groupe C cytoplasmique et nucléaire

Exemple de quatre mutants dont la VP2 se retrouve au cytoplasme et au noyau. La même combinaison d'anticorps est utilisée, et les photos sont la superposition des deux anticorps. Dans ce cas-ci également, les photos montrent la présence de VP2 et l'absence de capside. Magnitude de 400X

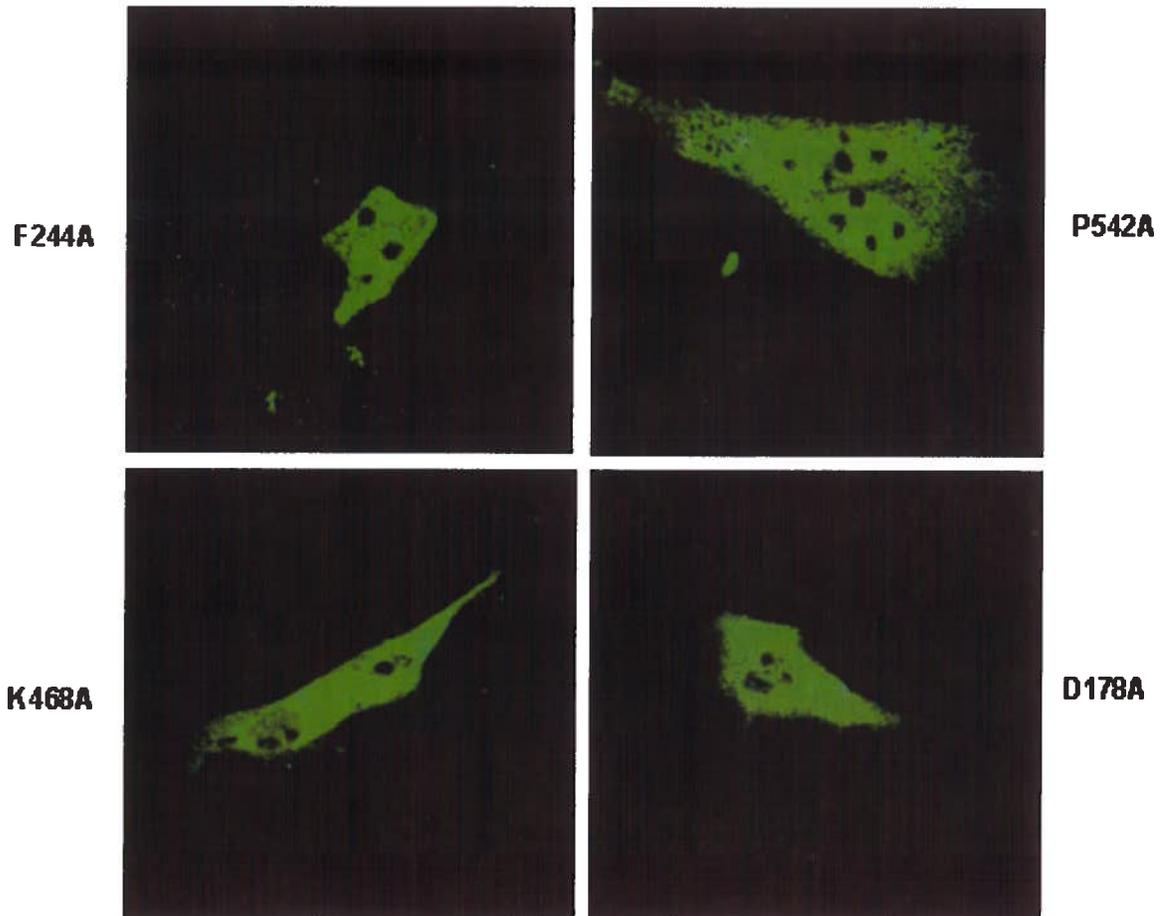


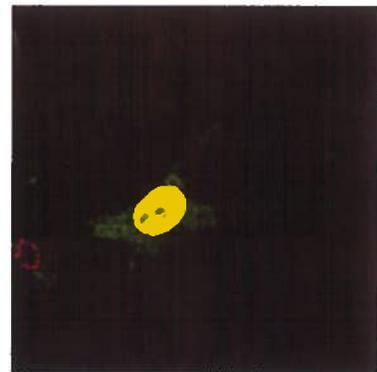
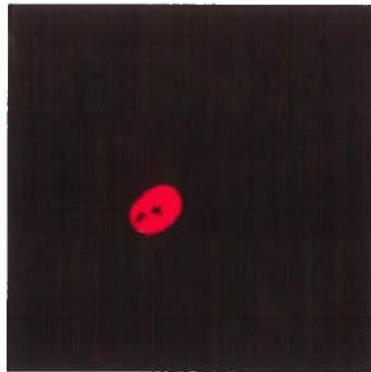
Figure 12 : Phénotype des cellules PT transfectées par les mutants du groupe C⁺

Les phénotypes des mutants du groupe C⁺ où la présence des capsides virales est observée. La même combinaison d'anticorps a été utilisée. Dans la première colonne, les photos de cellules représentent l'anticorps anti-VP2 identifié avec l'Alexa fluor 488 de lapin; dans la colonne du centre, l'anticorps 3C9-D11-H11 est identifié avec l'Alexa fluor 568 de souris, et la troisième colonne représente la superposition des deux images.

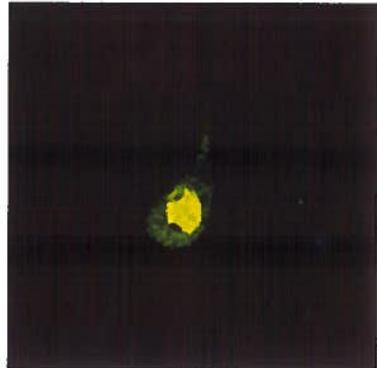
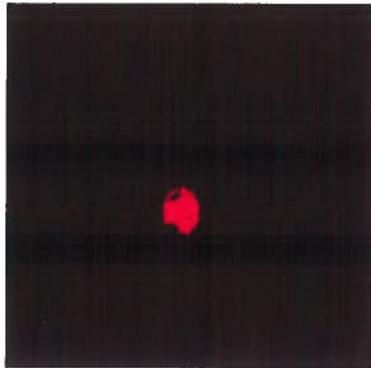
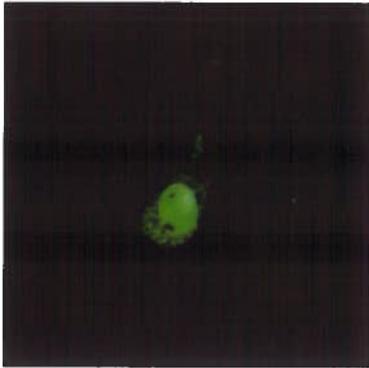
Anti-VP2

Anti-capside

Superposition



T170A

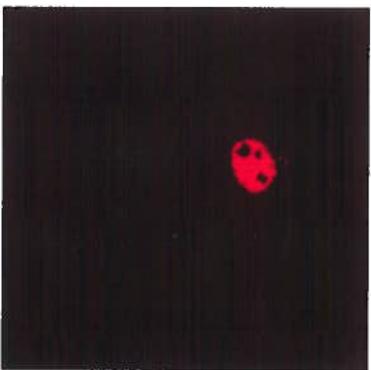


T258A

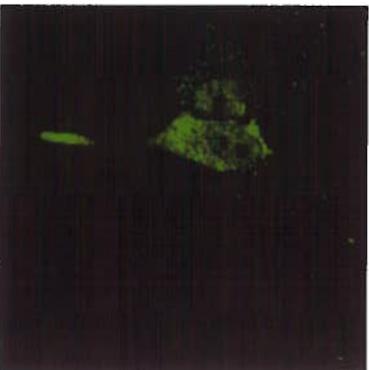
Anti-VP2

Anti-capside

Superposition



G259A



TG 258AA

3. Infectivité des mutants du groupe C⁺

Le test d'infectivité est utilisé pour démontrer l'infectivité des mutants. Comme la formation de la capsid virale est vitale pour une infection virale, le groupe C⁻ ne serait pas testé. Les membres de ce groupe, dont 22 des 26 mutants créés, sont capables de produire la protéine VP2 mais cette dernière n'est pas assemblée en capsid. Alors l'infectivité virale est inhibée. Cette observation permet d'appuyer l'hypothèse de ce projet qui stipulait que les aa conservés jouent plusieurs rôles important au niveau de la formation de la capsid et l'infectivité virale.

Pour les quatres mutants du groupe C⁺, l'IF a permis de démontrer que deux d'entres eux sont infectieux, soit M10 (T170A) et M15 (T258A). En effet, plusieurs foyers fluorescents sont observés pour les deux mutants et ces derniers sont plus nombreux à 48 heures. De plus, dans le cas de M15, un plus grand nombre de cellules fluorescentes est obtenu, M15 est presque aussi infectieux que le témoin positif. Les deux autres mutants soit M16 (G259A) et M17 (TG258AA), ne sont pas infectieux, puisqu'aucune cellule ne présente de la fluorescence après 24 ou 48 heures d'infection. Les résultats observés montrent que : le témoin donne 100% de cellules fluorescentes ; M15 donne alentour de 90% de cellules fluorescentes; M10 donne 50% de cellules fluorescentes; M16 et M17 ne donne aucune cellule fluorescente. Pour mieux quantifier l'infectivité de ces mutants, la méthode du titrage a été utilisée avec un seuil de détection de 1000 FFU/ml. Les résultats de la première préparation (2 semaines d'infection) sont :

- virus pur : 2.7×10^7 FFU/ml
- M15 (T258A): 2.2×10^7 FFU/ml
- M10 (T170A): 3.5×10^4 FFU/ml
- M16 (G259A): $< 10^3$ FFU/ml
- M17 (TG258AA): $< 10^3$ FFU/ml

Ceux de la deuxième préparation (48 heures d'infection) sont :

- virus pur : 1.3×10^6 FFU/ml
- M15 (T258A): 9.4×10^5 FFU/ml
- M10 (T170A): 1.5×10^4 FFU/ml
- M16 (G259A): $< 10^3$ FFU/ml
- M17 (TG258AA): $< 10^3$ FFU/ml

Le titrage permet de démontrer l'infectivité virale en observant le nombre d'unités formant des foyers fluorescents par mL. Les résultats de cette méthode montrent que le nombre de foyers fluorescents formés par le mutant T258A est presque pareil à celui du virus pur et est plus important par rapport au mutant T170A, soit de 2.2×10^7 FFU/ml pour la préparation I et de 9.4×10^5 FFU/ml pour la préparation II. Ce résultat permet de déduire que l'aa conservé T à la position 258 est le seul qui tolère la mutation et permet l'incorporation d'alanine avec presque pas d'effet sur le cycle viral. La même conclusion résulte de l'observation en IF. Le mutant T170A, avec un titrage de 3.5×10^4 FFU/ml (préparation I) et de 1.5×10^4 FFU/ml (préparation II), est le deuxième mutant infectieux. Les deux autres ne démontrent pas de foyers fluorescents, sous le seuil de détection et ces résultats confirment et appuient les observations obtenues en IF.

4. Quantification capsidique et génomique du groupe C⁺

La quantification est utilisée pour déterminer et comparer la formation de capsides virales avec le génome viral pour chaque mutant de ce groupe. Cette méthode permet de quantifier l'ADN viral et la capside virale pour chaque mutant et s'il y a une incorporation d'ADN dans les capsides virales.

En premier lieu, les capsides virales sont quantifiées par la méthode d'immunobuvardage de type Western. Le résultat obtenu ne montre aucune capside, même-ci la présence des capsides est observée pour le témoin positif (virus pur). Cette

méthode était répétée plusieurs fois sans résultat. Probablement, les mutations créées dans la VP2 pourraient rendre la capside du virus plus susceptible à la dégradation par cette méthode. Une autre technique aurait pu être utilisée pour séparer et quantifier la capside virale, c'est l'ultracentrifugation suivi de l'application du Dnases.

La deuxième quantification est celle du génome viral. Pour ce faire, la technique MIMIC a été utilisée. La figure 13 démontre la quantification de la première préparation de virus (infection de deux semaines). Résultats du MIMIC en génome (ge) par μl :

M10: 5.473×10^7 ge/ μl	M15: 1.316×10^8 ge/ μl
M16: 1.001×10^6 ge/ μl	M17: 2.113×10^6 ge/ μl

L'échantillon du mutant M15 de la préparation I est illustré dans la figure 14 (M15 en mauve). De plus, la figure 14 contient les échantillons des mutants faisant partie de la préparation II (infection de 48 heures).

M10: 8.098×10^7 ge/ μl	M15: 2.623×10^8 ge/ μl
M16: 1.211×10^8 ge/ μl	M17: 3.060×10^7 ge/ μl

Cette technique montre qu'il y avait une production génomique pour tous les mutants du groupe C⁺. Ce résultat n'est pas surprenant car les mutations créées dans ce projet sont au niveau de la protéine structurale VP2 et ainsi, elles ne devraient pas avoir d'effet sur la production du génome viral. Ces mutans n'affectent pas la production génomique mais seulement l'infectivité due à la formation de la capside et l'incorporation du génome viral. Par contre, la comparaison de la production génomique virale avec celle de la capside virale ne pourrait être déduite car la première quantification n'a pas fonctionné.

Figure 13 : PCR quantitatif MIMIC de la préparation I

Graphique représentant le nombre de copies génomiques par régression logarithmique. Plus explicitement, le logarithme de l'intensité des produits d'amplification du génome (I_g) sur l'intensité du MIMIC (I_m) [y] en fonction du logarithme des molécules MIMIC présentes [x]. Quand $y=0$, la quantité génomiques est égale à la quantité des molécules MIMIC.

La quantification des génomes de la préparation I, suite à la transfection de deux semaines.

Légende de nom donné aux mutants : M10 = QPCR on sample 10

M16 = QPCR on sample 16

M17 = QPCR on sample 17

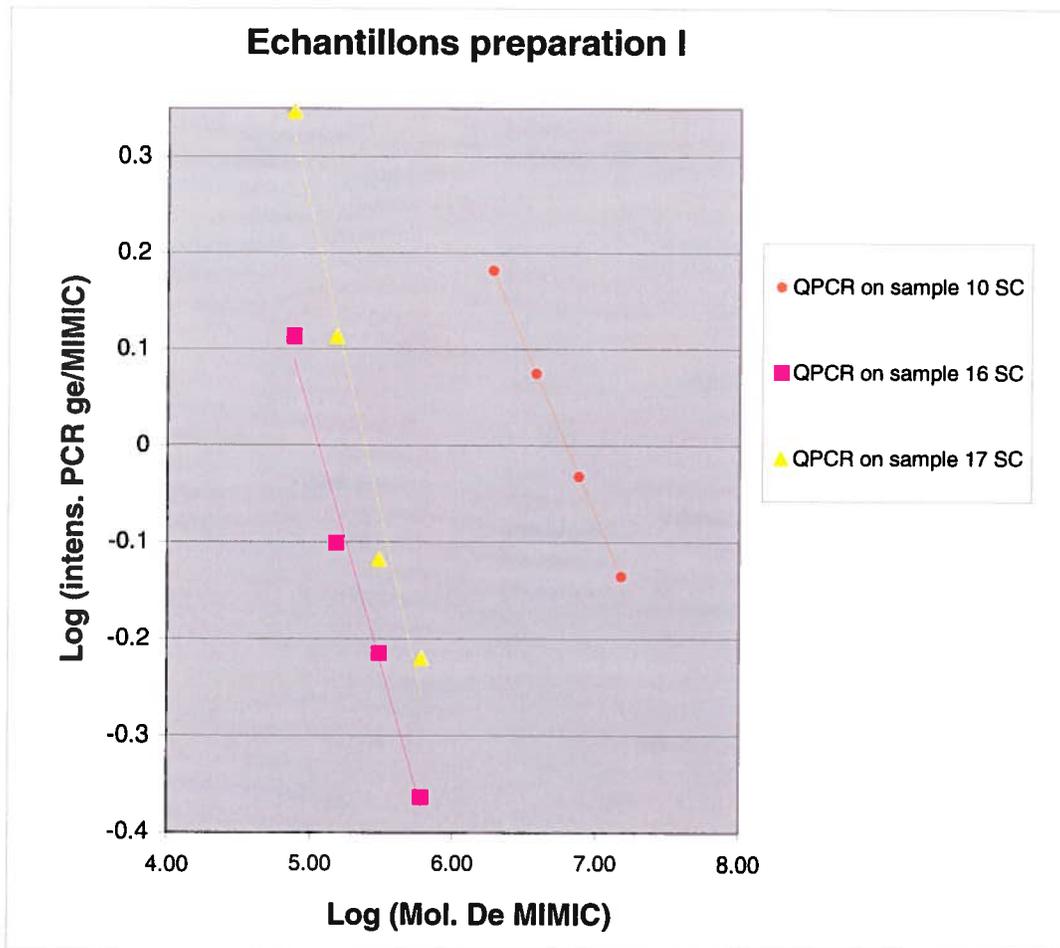


Figure 14 : PCR quantitatif MIMIC de la préparation II

Dans ce graphique, les 4 échantillons de la préparation II sont présentés, ainsi que l'échantillon M15 de la préparation I.

Légende de nom donné aux mutants :

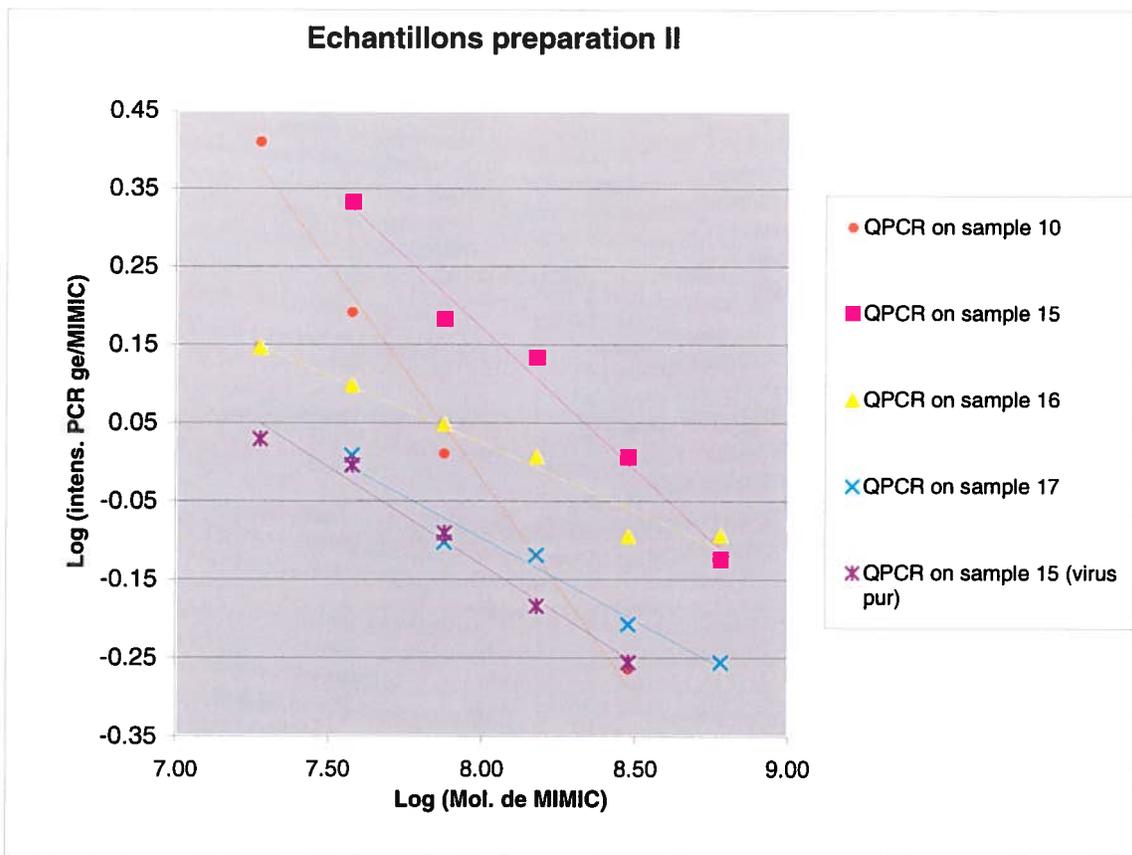
M10 = QPCR on sample 10

M15 = QPCR on sample 15

M16 = QPCR on sample 16

M17 = QPCR on sample 17

Et l'échantillon M15 de la préparation I, en mauve = QPCR on sample 15 (virus pur)



DISCUSSION

1. Production des mutants

Cette étude des régions conservées du PPV pourrait éclaircir le rôle de ces dernières par rapport au cycle viral de ce virus. En conséquent, les résultats obtenus dans ce projet pourraient aussi être appliqués à d'autres membres de la famille parvovirus.

Pour expliquer les résultats obtenus et leurs applications, les acides aminés mutés sont visualisés en 3-dimension dans la protéine. Chaque phénotype des acides aminés mutés est visualisé dans le programme « protein explorer ». Le positionnement des résidus est principalement visionné dans un trimère, connaissant que ce type d'oligomère serait le premier formé (Wu *et al.*, 1993; Agbandje *et al.*, 1995; Lombardo *et al.*, 2000 et 2002).

2. L'emplacement et l'effet des acides aminés du groupe C⁺ sur la protéine

Les mutants de ce groupe ne forment pas de capsid virale. Ce groupe englobe trois phénotypes en fonction de la localisation de la VP2 dans la cellule.

Pour comprendre l'effet des sept mutants appartenant au sous-groupe C⁺ cytoplasmique, la figure 15 démontre l'emplacement de ces résidus représentés par des globules blancs sur un trimère de protéines, en rubans et en « space filling ». Pour mieux différencier les trois polypeptides, chacun est illustré par une couleur différente soit le vert, le rouge et le bleu. Les sept acides aminés se positionnent au centre et intérieur de chaque polypeptide. En raison de leur position et leur phénotype suite à la mutation, ces derniers pourraient jouer un rôle dans le repliement de la protéine et en conséquent, ils pourraient être essentiels pour la bonne conformation monomérique de la VP2. Le mauvais repliement inhibe l'oligomérisation et le transport au noyau. Ces résultats viennent appuyer la littérature qui suggère que la conformité structurale de VP2 est

primordiale pour le transport au noyau (Lombardo *et al.*, 2000 et 2002). En altérant la conformation du polypeptide, l'oligomérisation serait également inhibée. Ainsi, la translocation nucléaire et la formation de la capsid ne seraient pas produites.

Des études avec le MVM ont démontrées que la protéine VP1 qui contient toute la séquence de la VP2 ainsi qu'une région unique à son extrémité N-terminale, a une capacité de translocation nucléaire indépendante de sa conformation protéique. Un signal de localisation nucléaire (SLN) existe dans cette région unique qui lui confère cette capacité de se transloquer au noyau. Des délétions créées dans la séquence de VP1 commune avec celle de VP2, n'ont pas empêché la translocation (Lombardo *et al.*, 2000 et 2002). Par contre, la VP2 est extrêmement sensible aux délétions dans sa séquence ce qui laisse présager que cette protéine est dépendante de sa conformation structurale pour être transporter au noyau (Lombardo *et al.*, 2000 et 2002).

Le groupe Riobos a démontré que deux types de trimères sont formés dans le cytoplasme de la cellule. Le premier type est un hétérotrimère de 200 kDa et contient une copie de la protéine VP1 et deux copies de la protéine VP2. Le deuxième est un homotrimère de 180 kDa et contient trois copies de la protéine VP2. Cette étude a aussi permis de montrer que le type de trimères transportés au noyau, exerce un contrôle morphogénique sur la symétrie icosaédrale de la capsid. Si le transport de homotrimères est inhibé, l'assemblage résultant est une large aggrégation d'entité virale et aucune capsid n'est formée. Ainsi la nécessité de bien contrôler le type de trimères transportés au noyau, et un pré-requis pour la bonne formation capsidale (Riobos *et al.*, 2006).

Figure 15: La position des résidus mutés de la VP2 du groupe C cytoplasmique dans un trimère.

Ces mutations se trouvent à l'intérieur de la protéine VP2 et jouent un rôle dans le repliement de cette dernière.

A) Représente un trimère en rubans

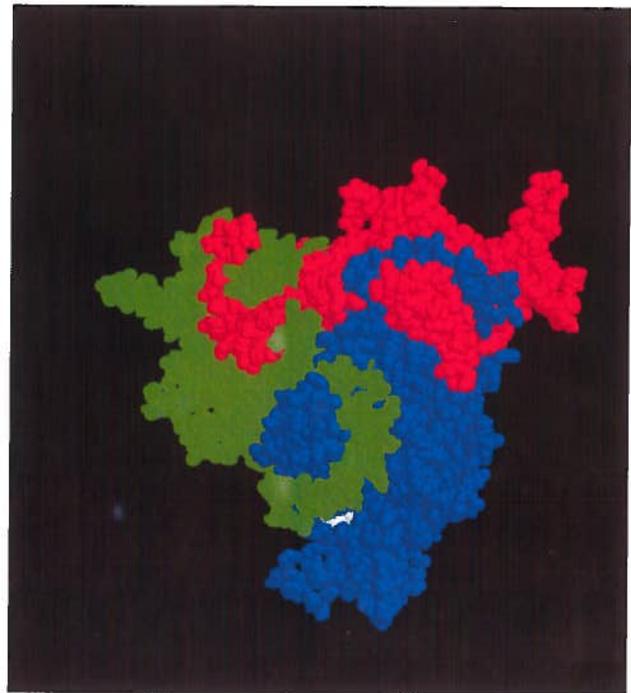
B) Le trimère est représenté en modèle « space filling ».

Pour différencier les trois protéines formant le trimère, différentes colorations sont utilisées soit le vert, le rouge et le bleu. Les globules blancs représentent les acides aminés mutés du groupe C cytoplasmique.

A



B

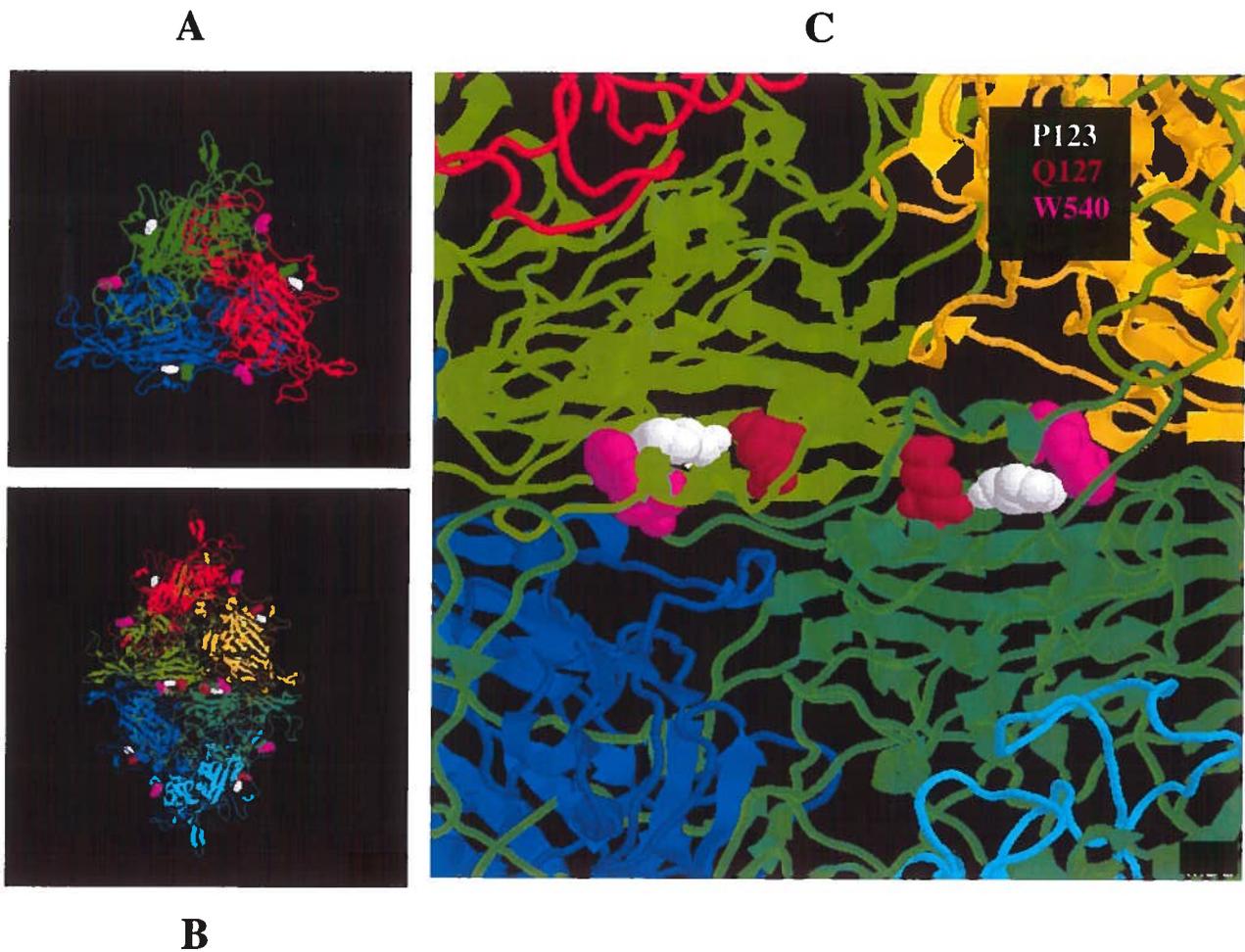


Le sous-groupe C⁺ nucléaire comprend trois membres. Dans la figure 16, le trimère est utilisé encore une fois pour illustrer l'emplacement des acides aminés mutés de la VP2 appartenant à ce sous-groupe. Ces derniers se trouvent aux trois bordures extérieures du trimère, proche de l'axe de symétrie d'ordre 2. Pour une meilleure observation, deux trimères sont amenés ensemble et un agrandissement permet de déduire que les mutations P123A, Q127A et W540A s'interagissent ensemble. En temps normal, au cours de l'assemblage de deux trimères, l'interaction avec ces trois acides aminés est produite par: deux résidus, P123 et Q127, d'un polypeptide dans un trimère interagissent avec le résidu W540 présent sur le polypeptide d'un autre trimère et vice versa (figure 16). Ainsi, ces résidus n'interfèrent pas dans la formation des trimères lesquels sont par conséquent transportés au noyau mais l'interférence est au niveau de l'assemblage. Chacune des mutations créées à ce niveau, pourrait empêcher cette interaction et inhiber l'association entre les trimères.

Les acides aminés de ce sous-groupe permettent une association de monomères en trimères et en cette forme, le transport au noyau se produit. Par contre, l'association entre trimères est inhibée et ainsi la formation de la capsid. L'étude menée par Rioloobos sur MVM montre qu'une introduction de larges acides aminés ou une délétion des résidus qui interagissent avec d'autres résidus entre trimères, conduit à une inhibition de reconnaissance inter-trimères. En conséquence, aucune capsid n'est assemblée (Rioloobos *et al.*, 2006). Et ainsi cette étude vient d'appuyer le résultat obtenu pour ce sous-groupe, ce qui laisse présager que le PPV est très similaire au MVM dans l'assemblage de la capsid.

Figure 16 : La position des résidus mutés de la VP2 du groupe C nucléaire dans un trimère

- A) Les acides aminés mutés de ce sous-groupe se trouvent aux trois extrémités du trimère, plus précisément autour de l'axe de symétrie d'ordre 2.
- B) À l'interphase de deux trimères, les résidus P123 et Q127 d'une protéine interagissent avec W540 d'une autre protéine.
- C) Un agrandissement montre l'interaction entre ces acides aminés

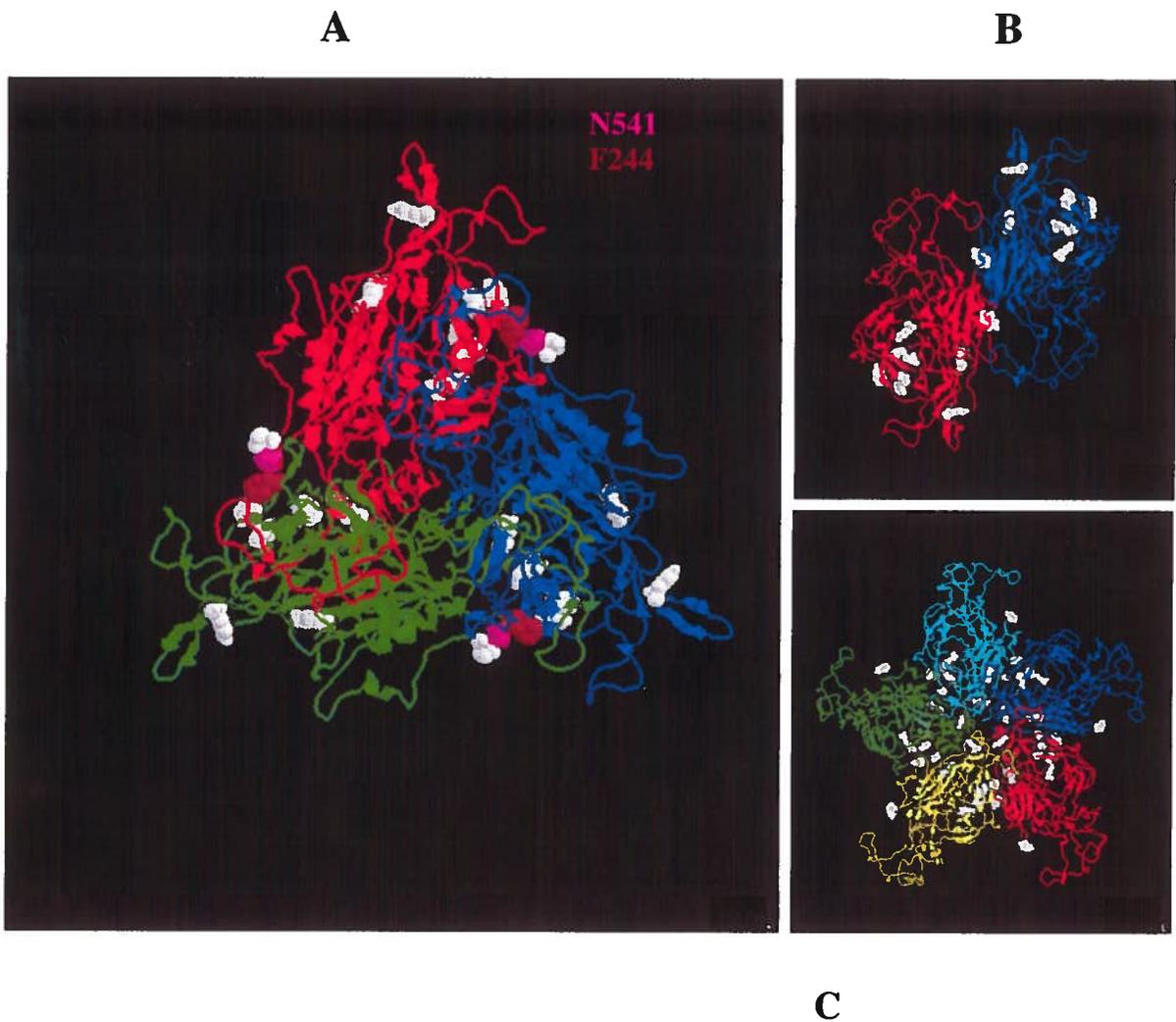


Pour le sous-groupe C⁻ cytoplasmique et nucléaire, un plus grand nombre de membres existe, soit 12 mutants. Le phénotype représente la VP2 répartie de manière égale dans les deux compartiments. Encore une fois, il n'y a pas de formation de capsid. La figure 17 montre le positionnement de ces résidus en globules blancs dans un trimère, dimère et pentamère. Chaque polypeptide est illustré par une couleur pour les différencier. Les mutants de ce sous-groupe sont dispersés dans toute la protéine et aucune interprétation ne peut être émise. Les seuls acides aminés qui interagissent ensemble dans chaque protéine sont N541 et F244 (globules rose et mauve, respectivement). Mais le rôle de ces derniers ne sont pas connus. Les résidus conservés de ce sous-groupe pourraient avoir plusieurs types de contacts non-covalents avec d'autres résidus pour promouvoir la stabilité de la protéine et ainsi garder sa bonne formation structurale. De plus, la grandeur physique des résidus est une déterminante importante dans la formation structurale et la stabilité.

La translocation au noyau pourrait être expliquée par le fait que ces mutants formeraient des trimères partiels ou contenant la VP1. La phosphorylation des acides aminés sérines (S) qui se trouvent dans la région N-terminale de VP2, pourraient jouer un rôle de signal d'exportation nucléaire et rediriger les oligomères non-assemblés vers le cytoplasme (Maroto *et al.*, 2000).

Figure 17 : Groupe C⁺ cytoplasmique et nucléaire

Les résidus de la VP2 du sous-groupe C⁺ cytoplasmique et nucléaire sont répartis à travers la protéine. Leurs positions sont visionnées sur un trimère en A, un dimère en B et un pentamère en C. Les seuls acides aminés mutés qui interagissent sont N541 d'une protéine avec F244 d'une autre protéine dans un trimère (A).



3. L'emplacement et l'effet des acides aminés du groupe C⁺ sur la protéine

Seulement quatre mutants sur 26 forment des capsides virales, soit : T170A, T258A, G259A et TG258AA. Les phénotypes obtenus pour ces mutants varient. Le mutant T258A ressemble le plus au témoin positif avec presque la même efficacité d'infection. Suivi du mutant T170A, l'infectivité de ce dernier est beaucoup moindre. Cependant les deux autres mutants, G259A et TG258AA, ne sont pas infectieux.

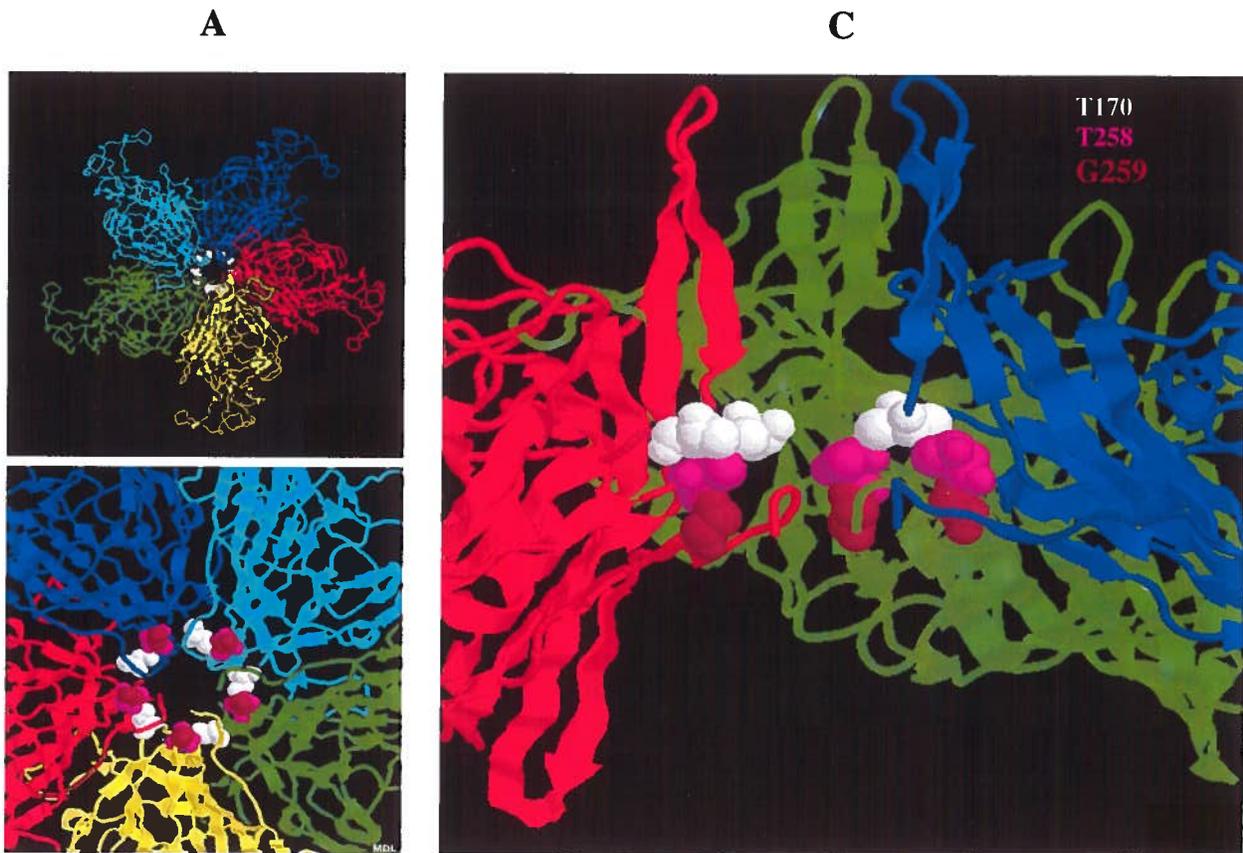
La figure 18 représente la position de ces résidus en globules dans la protéine illustrée dans un pentamère. Le type d'oligomérisation utilisé est le pentamère car l'assemblage et la formation de capsides sont obtenus pour ces mutants. Donc, ces derniers permettent l'oligomérisation en trimères, le transport au noyau et l'assemblage en capsides. Les acides aminés mutés de la VP2 faisant partie de ce groupe se retrouvent sur la paroi du canal cylindrique dans un pentamère. Les mutations à cette position pourraient avoir un rôle dans l'encapsidation du génome viral et l'infectivité virale.

Une fois la capside est formée, l'incorporation de l'ADN viral dans cette dernière serait requis pour obtenir des virions fonctionnels. Les mutants G259A et TG258AA ne sont pas infectieux même si T258A est un mutant infectieux. Comme l'acide aminé glycine (G) a une taille plus petite que alanine (A), l'incorporation de A à sa place pourrait causer une altération physique au canal cylindrique. L'incorporation du génome viral est observée pour le mutant G259A, ainsi que la sortie du N-terminale de la VP2. Mais pour le mutant TG258AA, l'encapsidation de l'ADN viral est inhibée.

Figure 18 : La position des résidus mutés de la VP2 du groupe C⁺ dans un pentamère

Les acides aminés mutés de la VP2 appartenant à ce groupe se retrouvent dans le canal cylindrique autour de l'axe de symétrie d'ordre 5

- A) La position des résidus dans un pentamère
- B) Une zone du pentamère agrandie
- C) Coupe transversale du pentamère



Chez le AAV, les résidus conservés au niveau du canal cylindrique jouent un rôle important par rapport à l'encapsidation génomique et l'infectivité virale. Cependant, ils ont un effet minime sur la formation de la capsid (Bleker *et al.*, 2004). Les résultats obtenus dans cette étude ont confirmé qu'il n'y avait pas de partielle incorporation de l'ADN viral, mais seulement une diminution de l'encapsidation génomique. La diminution de l'infectivité virale est causée par deux possibilités soient une diminution de la capacité a exposé le N-terminale de VP1 et par conséquent l'activité de PLA₂ est diminuée, ou bien, le N-terminale de VP1 est exposé au mauvais moment et l'activité prématurée de PLA₂ rend la capsid instable. En conclusion, cette étude a permis d'établir deux rôles au canal cylindrique. Le premier est au niveau de l'assemblage viral où le canal sert comme passage pour l'incorporation de l'ADN viral dans la capsid et le deuxième durant une infection, le canal permet l'exposition du N-terminale de VP1 et la présentation du domaine PLA₂ (Bleker *et al.*, 2004).

En 2005, le groupe Bleker a aussi trouvé que la protéine non-structurale Rep qui correspond à NS1 chez le PPV, s'associe avec la capsid au niveau des canaux cylindriques. Cette interaction est dépendante de la bonne conformation structurale de la capsid. De plus, ce complexe Rep-capsid serait nécessaire à l'incorporation de l'ADN viral dans la capsid (Bleker *et al.*, 2005).

Pour le mutant TG258AA, l'inhibition se passe au niveau de l'incorporation de l'ADN viral. Ça peut être relié à deux possibilités : soit que l'association de NS1 avec la capsid est inhibée par la mutation et ainsi l'incorporation génomique, ou le changement physique créé dans le canal cylindrique par cette même mutation causent cette inhibition.

Des études sur MVM mené par Farr et compagnie ont montré qu'un acide aminé leucine (L172) existe dans la région la plus resserrée dans le canal cylindrique. La mutation ponctuelle de leucine à thréonine permet au virus de rester infectieux à 37°C mais peut aussi initier une infection à 32°C ou suite à une exposition d'un pH neutre. Ils ont montré que même à la température de la pièce, le N-terminale de VP1 ainsi que le génome viral sont exposés. Le canal cylindrique sert comme un passage pour

l'externalisation des N-terminaux de VP2 suivi de VP1. Un des canaux de la capsid est utilisé pour le transport du génome viral. L'exposition de la région unique de VP1 ainsi que l'externalisation du génome viral qui sont dépendants du pH, sont contrôlés par le clivage du N-terminale de VP2 et de la présence du résidu leucine. Dans leurs études, ce groupe de chercheurs a montré que le N-terminale intact de VP2 aide à garder et protéger l'intégrité des virions. Suite à son clivage, la capsid devient prédisposée à une transition structurale qui lui permet d'être plus sensible au changement de pH (Farr *et al.*, 2004 et 2006). Des résidus conservés au niveau de l'axe de symétrie d'ordre 5 sont aussi impliqués dans le réarrangement conformationnel de la capsid. Le réarrangement permet l'expulsion du N-terminale de VP2, et par conséquent affecte l'infectivité virale (Reguera *et al.*, 2004). Pour ce qui est du mutant G259A, le blocage se produit au niveau de l'infection, soit l'expulsion du N-terminale de VP1 est inhibée ou elle est prématurée, ce qui rend la capsid instable et l'intégrité des virions est compromise.

Un autre groupe de chercheurs ont démontré que des acides aminés qui interagissent avec l'ADN viral peuvent : causer une réduction dramatique ou modérée d'infection, être déficiente au niveau de l'assemblage en capsides, et finalement, former de capsides mais vides. Ces résidus sont impliqués dans plusieurs types d'interactions non-covalentes avec le génome viral. Mais un minimum d'un résidu acide est requis pour chacune des interactions avec l'ADN viral (Reguera *et al.*, 2005).

Le génome viral est encapsidé suite à l'assemblage de la capsid. L'incorporation du brin négatif de l'ADN viral procède efficacement pour le premier tiers de la longueur mais elle se bloque par la suite. À ce stage, l'exposition du N-terminale de VP2 à la surface de la capsid pourrait être nécessaire pour permettre la poursuite de l'incorporation du génome viral. Les interactions qui existent entre l'ADN viral et les résidus à l'intérieur de la capsid exercent assez de pression pour permettre la sortie du N-terminale de VP2. D'autant plus, elles causent une transition structurale dans la capsid qui engendre une ouverture dans chaque canal pour permettre cette sortie. Cette expulsion du N-terminale de VP2 est un mécanisme pour sceller les pores (Cotmore & Tattersall, 2005).

Par la méthode de « atomic force microscopy » (AFM), la rigidité de la capsidie a été testée. Il y avait une augmentation de 3%, 40% et 140% pour les axes de symétrie d'ordre 5, 3 et 2 respectivement, suite à l'incorporation d'ADN dans la particule virale. L'inflexibilité de la capsidie est réinforcée par la présence de l'ADN viral (Carrasco *et al.*, 2006).

Les deux mutants T170A et T258A contiennent l'ADN viral et sont infectieux. Par contre, il existe une réduction d'infection qui est modérée pour T170A et minime pour T258A par rapport au virus pur. Cette réduction peut être reliée à une instabilité des virions possiblement expliquée par une expulsion prématurée du N-terminal de VP1.

La capsidie virale a une plus grande rigidité suite à l'incorporation du génome viral, mais même avec cette rigidité la capsidie reste instable face à des traitements physico-chimiques utilisés lors de la purification virale. La stabilité de la particule virale pour tous les mutants de ce groupe est compromise, incluant le mutant T258A.

Ce projet projette des résultats très utiles pour le PPV au niveau de l'assemblage et l'infectivité virale. L'effet des résidus conservés de la protéine structurale VP2 jouent plusieurs rôles critiques et à plusieurs niveaux dans le cycle viral. Les études qui sont produites à ce sujet sur le PPV, sont minimes. Mais, il existe tellement de similarités dans la famille parvovirus que les résultats obtenus dans d'autres projets permettent de mieux interpréter les données obtenues ici.

CONCLUSION

Les résidus conservés de la VP2 jouent plusieurs rôles importants dans la formation de la capsidie et l'infectivité virale.

Le projet de recherche réalisé a permis une meilleure compréhension des étapes de la formation de la capsidie du PPV. Premièrement, les VP2 se traduisent en monomères et s'assemblent en trimères dans le cytoplasme. Sous cette forme, les VP2 acquièrent un signal de localisation nucléaire (SLN) qui leur permet d'être transportées au noyau. Dans le sous-groupe C⁻ cytoplasmique, les mutations altèrent la conformation de la VP2, ainsi un mauvais repliement de cette protéine empêche l'oligomérisation en trimères et donc la formation du SLN nécessaire au transport jusqu'au noyau. Ces résultats appuient l'hypothèse que l'association des protéines en trimères est nécessaire à la translocation nucléaire (Lombardo *et al.*, 2000 et 2002). Par ailleurs, la VP1 pourrait également jouer un rôle dans ce processus. En effet, il est connu qu'en raison de la présence d'un SLN à son extrémité N-terminale, VP1, sous la forme monomérique, peut se transloquer au noyau. Le trimère formé pourrait donc contenir de la VP1 rendant possible le processus de transport jusqu'au noyau. Cependant, le rôle de VP1 n'a pas été étudié dans ce projet.

Une fois dans le noyau, les trimères s'associent pour donner la forme finale à la capsidie. Les acides aminés mutés de la VP2 du sous-groupe C⁻ nucléaire permettent la formation de trimères par contre ils inhibent l'assemblage entre les trimères et ainsi la formation de la capsidie.

Une fois la capsidie formée, l'ADN viral est incorporé par les canaux cylindriques se trouvant aux axes de symétrie d'ordre 5. Le mutant TG258AA qui se positionne à ce niveau produit des capsides vides. Par contre, les autres membres du groupe C⁺, soit T170A, T258A et G259A, sont capables d'incorporés l'ADN viral dans la capsidie. Dans l'exemple du mutant G259A, les virions produits ne sont pas infectieux. Cet acide aminé pourrait être impliqué dans une expulsion prématurée du N-terminale de VP1 et ainsi l'infection virale est inhibée.

Enfin, les mutants T170A et T258A sont infectieux, mais varient dans l'efficacité d'infection, T258A étant plus infectieux que T170A. T258A reste cependant moins infectieux que les témoins positifs. Cette diminution d'infection pourrait être reliée encore une fois à la sortie prématurée du N-terminale de VP1. Et la stabilité des capsides formées par ce groupe est aussi compromise par cette sortie.

Les résultats obtenus dans ce projet, d'une part ont permis de mieux comprendre la façon dont les particules virales sont assemblées, et d'autre part viennent appuyer et confirmer l'hypothèse selon laquelle les trimères sont la base de la formation de la capside puisque les monomères d'un trimère sont inter-reliés et contiennent le plus de contact entre eux (Wu *et al.*, 1993; Agbandje *et al.*, 1995; Lombardo *et al.*, 2000 et 2002). Ainsi, comme la littérature le suggère, les trimères sont le premier type d'oligomérisation dans la formation de la capside. Pour une meilleure confirmation de cette déduction, la vérification de la présence de trimères par électrophorèse et ultracentrifugation serait importante. De plus, l'étude du rôle de la VP1 dans la translocation nucléaire pourrait être effectuée en utilisant un système baculovirus, ainsi que par des délétions au niveau de la VP1, qui aideraient à une meilleure compréhension de la fonction de VP1 dans la formation de la capside. Une autre analyse est l'importance du canal cylindrique. L'introduction de l'ADN viral et la sortie des N-terminaux de VP2 et VP1 se fait via ce canal. Ainsi le canal cylindrique qui se trouve autour de l'axe de symétrie d'ordre 5 peut contrôler l'assemblage au niveau de l'incorporation du génome viral et l'infectivité virale au niveau de l'expulsion des N-terminaux de VP2 et de VP1 (Bleker *et al.*, 2004; Farr *et al.*, 2004 et 2006; Reguera *et al.*, 2004). L'infectivité virale peut être compromise même s'il y a une incorporation de l'ADN virale.

En conclusion, les effets des mutations ponctuelles dans les régions conservées de la VP2 engendrent des résultats désastreux pour le PPV. L'infectivité du virus est abolie dans presque tous les mutants (excepté T170A et T258A). Cette étude a permis une meilleure compréhension au niveau de l'assemblage et l'infectivité du virus et ces résultats pourraient être appliqués aux autres parvovirus appartenant à la même famille.

BIBLIOGRAPHIE

AGBANDJE, M., C.R. Parrish, M.G. Rossmann, 1995. «*The Structure of Parvoviruses*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 299-309.

AGBANDJE-MCKENNA, M., A.L. Lamas-Saiz, F. Wang, P. Tattersall, M.G. Rossmann, 1998. «*Functional Implications of the Structure of the Murine Parvovirus, Minute Virus of Mice*». Structure. Vol. 6, no. 11, p. 1369-1381.

ARELLA, M., S. Garzon, J. Bergeron, P. Tijssen, 1990. «*Physicochemical Properties, Production, and Purification of Parvoviruses*». Handbook of Parvoviruses. Vol. I, chap. 2. (Tijssen, P., éd.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 11-30.

BARBIS, D.P., S.F. Chang, C.R. Parrish, 1992. «*Mutations Adjacent to the Dimple of the Canine Parvovirus Capsid Structure Affect Sialic Acid Binding*». Virology. Vol. 191, no. 1, p. 301-308.

BASAK, S., Turner, H., 1992. «*Infectious Entry Pathway for Canine Parvovirus*». Virology. Vol. 186, no. 2, p. 368-376.

BERGERON, J., J. Menezes, P. Tijssen, 1993. «*Genomic Organization and Mapping of Transcription and Translation Products of the NADL-2 Strain of Porcine Parvovirus*». Virology. Vol. 197, p. 86-98.

BERGERON, J., B. Hébert, P. Tijssen, 1996. «*Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus: Identification of the Allotropic Determinant and Comparison with Those of NADL-2 and Field Isolates*». Journal of Virology. Vol. 70, p. 2508-2515.

BLECKER, S., Sonntag, F., Kleinschmidt, J.A., 2004. «*Mutational Analysis of Narrow Pores at the Fivefold Symmetry Axes of Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids Reveals a Dual Role in Genome Packaging and Activation of Phospholipase A2 Activity*». Journal of Virology, vol. 79, no. 4, p.2528-2540.

BLECKER, S., Pawlita, M., Kleinschmidt, J.A., 2005. «*Impact of Capsid Conformation and Rep-Capsid Interactions on Adeno-Associated Virus Type 2 Genome Packaging*». Journal of Virology, vol. 80, no. 2, p. 810-820.

BOURGUIGNON, G.J., P.J. Tattersall, D.C. Ward, 1976. «*DNA of Minute Virus of Mice: Self-Priming, Non-Permuted, Single-Stranded Genome with a 5'-Terminal Hairpin Duplex*». Journal of Virology. Vol. 20, no. 1, p. 290-306.

CARRASCO, C., Carreira, A., Schaap, A.T., Serena, P.A., Gómez-Herrero, J., Mateu, M.G., Pablo, P.J., 2006. «*DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus*». PNAS, vol. 103, no. 37, p. 13706-13711.

CHANG, S.F., J.Y. Sgro, C.R. Parrish, 1992. «*Multiple Amino Acids in the Capsid Structure of Canine Parvovirus Coordinately Determine the Canine Host Range and Specific Antigenic and Hemagglutination Properties*». Journal of Virology. Vol. 66, no. 12, p. 6858-6867.

CHAPMAN, M.S., M.G. Rossmann, 1993. «*Structure, Sequence, and Function Correlations Among Parvoviruses*». Virology. Vol. 194, no. 2, p. 491-508.

CHOI, C.S., T.W. Molitor, H.S. Joo, R. Gunther, 1987. «*Pathogenicity of a Skin Isolate of Porcine Parvovirus in Swine Fetuses*». Veterinary Microbiology. Vol. 15, no. 1-2, p. 19-29.

COTMORE, S.F., P. Tattersall, 1987. «*The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates*». Advances in Virus Research. Vol. 33 p. 91-174.

COTMORE, S.F., P. Tattersall, 1989. «*A Genome-Linked Copy of the NS-1 Polypeptide is Located on the Outside of Infectious Parvovirus Particles*». Journal of Virology. Vol. 63, no. 9, p. 3902-3911.

COTMORE, S.F., P. Tattersall, 1995. «*DNA Replication in the Autonomous Parvoviruses*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 271-281.

COTMORE, S.F., D'abramo, A.M. JR., Ticknor, C.M., Tattersal, P., 1999. «*Controlled Conformational Transitions in the MVM Virion Expose the VP1 N-terminus and Viral Genome without Particle Disassembly*». Virology. Vol. 254, no. 1, p. 169-181.

COTMORE, S.F., Tattersall, P., 2005. «*Encapsidation of minute virus of mice DNA: Aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes*». Virology, vol. 336, p.100-112.

DOERIG, C., B. Hirt, P. Beard, J.-P. Antonietti, 1988. «*Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter*». Journal of General Virology. Vol. 69, no. 10, p. 2563-2573.

DOERIG, C., B. Hirt, J.-P. Antonietti, P. Beard, 1990. «*Nonstructural Protein of Parvovirus B19 and Minute Virus of Mice Controls Transcription*». Journal of Virology. Vol. 64, p. 387-396.

DOUAR, A.M., K. Poulard, D. Stockholm, O. Danos, 2001. «*Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the Late Endosomal Compartment and Proteasome Degradation*». Journal of Virology. Vol. 75, no. 4, p. 1824-1833.

DUNNE, H.W., J.C. Gobble, J.R. Hokanson, D.C. Kradel, G.R. Bubash, 1965. «*Porcine Reproductive Failure Associated with a Newly Defined "SMEDI" Group of Picornavirus*». American Journal of Veterinary Research. Vol. 26, no. 115, p. 1284-1290.

FARR, G.A., Tattersall, P., 2004. «*A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection*». Virology, Vol. 323, p.243-256.

FARR, G.A., Cotmore, S.F., Tattersall, P., 2005. «*VP2 Cleavage and the Leucine Ring at the Base of the Fivefold Cylinder Control pH-Dependent Externalization of both the VP1 N Terminus and the Genome of Minute Virus of Mice*». Journal of Virology, vol. 80, no. 1, p. 161-171.

GIROD, A., C.E. Wobus, Z. Zádori, M. Ried, K. Leike, P. Tijssen, J.A. Kleinschmidt, M. Hallek, 2002. «*The VP1 Capsid Protein of Adeno-Associated Virus Type 2 is Carrying a Phospholipase A₂ Domain Required for Virus Infectivity*». Journal of General Virology. Vol. 83, p. 973-978.

HARDING, M.J., Molitor, T.W., 1992. «*A Monoclonal Antibody which Recognizes Cell Surface Antigen and Inhibits Porcine Parvovirus Replication*». Archives of Virology. Vol. 123, no. 3-4, p. 323-333.

HUEFFER, K., Parrish, C.R., 2003. «*Parvovirus Host Range, Cell Tropism and Evolution*». Current Opinion in Microbiology. Vol. 6, p. 392-398.

JACOBY, R.O., Ball-Goodrich, L.J., Besselsen, D.G., McKisic, M.D., Riley, L.K., Smith, A.L., 1996. «*Rodent parvovirus infections* ». Laboratory Animal Science. Vol. 46, no. 4, p.370-380.

JOO, H.S., C.R. Donaldson-Wood, R.H. Johnson, 1976. «*Observations on the Pathogenesis of Porcine Parvovirus Infection*». Archives of Virology. Vol. 51, p. 123-129.

KIM, J., C., Chae, 2004. «*Concurrent presence of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in retrospective cases of exudative epidermitis in pigs*». Veterinary Journal. Vol. 137, p. 104-106.

KRESSE, J.I., W.D. Taylor, W.W. Stewart, K.A. Eernisse, 1985. «*Parvovirus Infection in Pigs with Necrotic and Vesicle-Like Lesions*». Veterinary Microbiology. Vol. 10, no. 6, p. 525-531.

LI, X., S.L. Rhode III, 1991. «*Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro*». Virology. Vol. 184, no. 1, p. 117-130.

LI, X., S.L. Rhode III, 1993. «*The parvovirus H-1 NS2 protein affects viral gene expression through sequences in the 3' untranslated region*». Virology. Vol. 194, no. 1, p. 10-19.

LOMBARDO, E., J.C. Ramirez, M. Agbandje-McKenna, J.M. Almendral, 2000. «*A Beta-Stranded Motif Drives Capsid Protein Oligomers of the Parvovirus of Mice into the Nucleus for Viral Assembly*». Journal of Virology. Vol. 74, no. 8, p. 3804-3814.

LOMBARDO, E., Ramírez, J.C., Garcia, J., Almendral, J.M., 2002. «*Complementary Roles of Multiple Nuclear Targeting Signals in the Capsid Proteins of the Parvovirus Minute Virus of Mice during Assembly and Onset of Infection*». Journal of Virology. Vol. 76, no. 14, p. 7049-7059.

MAROTO, B., Ramirez, J.C., Almendral, J.M., 2000. «*Phosphorylation status of the parvovirus minute virus of mice particle: mapping and biological relevance of the major phosphorylation sites*». Journal of Virology, vol. 74, p.10892-10902.

MENGELING, W.L., 1972. «*Porcine Parvovirus: Properties and Prevalence of a Strain Isolated in the United States*». American Journal of Veterinary Research. Vol. 33, no. 11, p. 2239-2248.

MENGELING, W.L., R.C. Cutlip, 1976. «*Reproductive Disease Experimentally Induced by Exposing Pregnant Gilts to Porcine Parvovirus*». American Journal of Veterinary Research. Vol. 37, no. 12, p. 1393-1400.

MENGELING, W.L., J.F. Ridpath, A.C. Vorwald, 1988. «*Size and Antigenic Comparisons Among the Structural Proteins of Selected Autonomous Parvoviruses*». Journal of General Virology. Vol. 69, no. 4, p. 825-837.

MOLITOR, T.W., H.S. Joo, M.S. Collett, 1985. «*Identification and Characterization of a Porcine Parvovirus Nonstructural Polypeptide*». Journal of Virology. Vol. 55, p. 554-559.

NAEGER, L.K., J. Cater, D.J. Pintel, 1990. «*The Small Nonstructural Protein (NS2) of the Parvovirus Minute Virus of Mice is Required for Efficient DNA Replication and Infectious Virus Production in a Cell-Type-Specific Manner*». Journal of Virology. Vol. 64, no. 12, p. 6166-6175.

NAEGER, L.K., N. Salomé, D.J. Pintel, 1993. «*NS2 is Required for Efficient Translation of Viral mRNA in Minute Virus of Mice-Infected Murine Cells*». Journal of Virology. Vol. 67, p. 1034-1043.

NIELSEN, J., Ronsholt, L., Sorensen, K.J., 1991. «*Experimental in utero Infection of Pig Fetuses with Porcine Parvovirus (PPV)*». Veterinary Microbiology. Vol. 28, no. 1, p. 1-11.

ORAVEERAKUL, K., C.-S. Choi, T.W. Molitor, 1992. «*Restriction of Porcine Parvovirus Replication in Nonpermissive Cells*». Journal of Virology. Vol. 66, p. 715-722.

ORAVEERAKUL, K., C.-S. Choi, T.W. Molitor, 1993. «*Tissue tropisms of porcine parvovirus in swines*». Archives of Virology. Vol. 130, p. 377-389.

PARKER, J.S.L., C.R. Parrish, 2000. «*Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis*,

Followed by Slower Intracellular Trafficking». Journal of Virology. Vol. 74, no. 4, p. 1919-1930.

PARKER, J.S., W.J. Murphy, D. Wang, S.J. O'Brien, C.R. Parrish, 2001. «*Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors to Bind, Enter, and Infect Cells*». Journal of Virology. Vol. 75, no. 8, p. 3896-3902.

PARRISH, C.R., Aquadro, C.F., Strassheim, M.L., Evermann, J.F., Sgro, J.Y., Mohammed, H.O., 1991. «*Rapid Antigenic-type Replacement and DNA Sequence Evolution of Canine Parvovirus*». Journal of Virology. Vol. 65, no. 12, p. 6544-6552.

PAUL, P.S., MENGELING, W.L., 1980. «*Effect of Vaccinal and Passive Immunity on Experimental Infection of Pigs with Porcine Parvovirus*». American Journal of veterinary Research. Vol. 41, no. 9, p. 1368-1371.

PINTEL, D.J., A. Gersappe, D. Haut, J. Pearson, 1995. «*Determinants that govern alternative splicing of parvovirus pre-mRNAs*». Seminars in Virology. Vol. 6, no. 5, p. 283-290.

REDDY, V.S., Natarajan, P., Okerberg, B., Li, K., Damodaran, K.V., Morton, R.T., Brooks III, C.L., Johnson, J.E., 2001. «*Virus Particle Explorer (VIPER), a Website for Virus Capsid Structures and Their Computational Analyses*». Journal of Virology, vol. 75, no. 24, p. 11943-11947.

REGUERA, J., Carreira, A., Riobos, L., Almendral, J.M., Mateu, M.G., 2004. «*Role of Interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid*». PNAS, vol. 101, no. 9, p. 2724-2729.

REGUERA, J., Grueso, E., Carreira, A., Sánchez-Martínez, C., Almendral, J., Mateu, M.G., 2005. «*Functional Relevance of Amino Acid Residues Involved in Interactions*

with Ordered Nucleic Acid in a Spherical Virus». The Journal of Biological Chemistry. Vol. 280, no. 18, p. 17969-17977.

RIDPATH, J.F., W.L. Mengeling, 1988. «*Uptake of Porcine Parvovirus into Host and Nonhost Cells Suggests Host Specificity is Determined by Intracellular Factors*». Virus Research. Vol. 10, no. 1, p. 17-27.

RIOLOBOS, L., Reguera, J., Mateu, M.G., Almendral, J.M., 2006. «*Nuclear Transport of Trimeric Assembly Intermediates exerts a Morphogenetic Control on the Icosahedral Parvovirus Capsid*». Journal of Molecular Biology, vol. 357, p.1026-1038.

SIEGL, G., 1984. «*Biology of pathogenicity of autonomous parvovirus*» The Parvoviruses. K.I. Berns (éd.), New York, Plenum.

SIEGL, G., R.C. Bates, K.I. Berns, B.J. Carter, D.C. Kelly, E. Kurstak, P. Tattersall, 1985.«*Characteristics and Taxonomy of Parvoviridae*». Intervirology. Vol. 23, no. 2, p. 61-73.

SIMPSON, A.A., B. Hébert, G.M. Sullivan, C.R. Parrish, Z. Zádori, P. Tijssen, M.G. Rossmann, 2002. «*The Structure of Porcine Parvovirus: Comparison with Related Viruses*». Journal of Molecular Biology. Vol. 315, no. 5, p. 1189-1198.

SUIKKANEN, S., K. Saajarvi, J. Hirsimaki, O. Valilehto, H. Reunanen, M. Vihinen-Ranta, M. Vuento, 2002. «*Role of Recycling Endosomes and Lysosomes in Dynein-Dependent Entry of Canine Parvovirus*». Journal of Virology. Vol. 76, no. 9, p. 4401-4411.

TATTERSALL, P., P.J. Cawte, A.J. Shatkin, D.C. Ward, 1976. «*Three Structural Polypeptides Coded for by Minute Virus of Mice, a Parvovirus*». Journal of Virology. Vol. 20, no. 1, p. 273-289.

TATTERSALL, P., A.J. Shatkin, D.C. Ward, 1977. «*Sequence Homology Between the Structural Polypeptides of Minute Virus of Mice*». Journal of Molecular Biology. Vol. 111, no. 4, p. 375-394.

TATTERSALL, P., M. Bergoin, M.E. Bloom, K.E. Brown, R.M. Linden, N. Muzyczka, C.R. Parrish, P. Tijssen, 2005. Part II: The Single Stranded DNA Viruses: *Parvoviridae*. In: «*Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*». (C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball, eds). Elsevier, Academic Press. p. 353-369.

TIJSSEN, P., 1990. «*Introduction: Parvoviruses*». Handbook of Parvoviruses. Vol. I, chap. 1. (Tijssen, P., éd.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 3-11.

TIJSSEN, P., J. Bergeron, R. Dubuc, B. Hébert, 1995. «*Minor Genetic Changes Among Porcine Parvovirus Groups are Responsible for Major Distinguishing Biological Properties*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 319-328.

TIJSSEN, P., 1999. «*Molecular and Structural basis of the Evolution of Parvovirus Tropism*». Acta Veterinaria Hung. Vol. 47, no. 3, p. 379-394.

TIJSSEN, P., J. Bergeron, 1999. «*Parvoviruses: Rodents, Pigs, Cattle and Waterfowl*». Encyclopedia of Virology. Academic Press, San Diego, CA, p. 1167-1175.

TRUYEN, U., Parrish, C.R., 1992. «*Canine and Feline Host Ranges of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus: Distinct Host Cell Tropisms of each Virus in vitro and in vivo*». Journal of Virology. Vol. 66, no. 9, p. 5399-5408.

TSAO, J., M.S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Luo, T.J. Smith, M.G. Rossmann, R.W. Compans, C.R. Parrish, 1991. «*The Three-Dimensional Structure of Canine Parvovirus and its Functional Implications*». Science. Vol. 251, no. 5000, p. 1456-1464.

TULLIS, G.E., L.R. Burger, D.J. Pintel, 1993. «*The Minor Capsid Protein VP1 of the Autonomous Parvovirus Minute Virus of Mice is Dispensable for Encapsulation of Progeny Single-Stranded DNA but is Required for Infectivity*». Journal of Virology. Vol. 67, no. 1, p. 131-141.

VANACKER, J.-M., J. Rommelaere, 1995. «*Nonstructural Proteins of Autonomous Parvoviruses: from Cellular Effects to Molecular Mechanisms*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 291-297.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner, 2000. «*Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*». San Diego, Academic Press.

VASUDEVACHARYA, J., R.W. Compans, 1992. «*The NS and Capsid Genes Determine the Host Range of Porcine Parvovirus*». Virology. Vol. 187, no. 2, p. 515-524.

VIHINEN-RANTA, M., L. Kakkola, A. Kalela, P. Vilja, M. Vuento, 1997. «*Characterization of a Nuclear Localization Signal of Canine Parvovirus Capsid Proteins*». European Journal of Biochemistry. Vol. 250, no. 2, p. 389-394.

VIHINEN-RANTA, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., Vuento, M., 1998. «*Intracellular Route of Canine Parvovirus Entry*». Journal of Virology. Vol. 72, no. 1, p. 802-806.

VIHINEN-RANTA, M., D. Wang, W.S. Weichert, C.R. Parrish, 2002. «*The VP1 N-Terminal Sequence of Canine Parvovirus Affects Nuclear Transport of Capsids and Efficient Cell Infection*». Journal of Virology. Vol. 76, no. 4, p. 1884-1891.

WEICHERT, W.S., J.S. Parker, A.T. Wahid, S.F. Chang, E. Meier, C.R. Parrish, 1998. «*Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and its Role in Infection*». Virology. Vol. 250, no. 1, p. 106-117.

WHITAKER, H. K., S.M. Neu, L.W. Pace, 1990. «*Parvovirus infection in pigs with exudative skin disease*». Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol. 2, p. 244-246.

WU, H., M.G. Rossmann, 1993. «*The Canine Parvovirus Empty Capsid Structure*». Journal of Molecular Biology. Vol. 233, p. 231-244.

XIE, Q., Chapman, M.S., 1996. «*Canine Parvovirus Capsid Structure, analyzed at 2.9 Å resolution*». Journal of Molecular Biology. Vol. 264, no. 6, p. 497-520.

ZÁDORI, Z., J. Szelei, M.-C. Lacoste, Y. Li, S. Gariépy, P. Raymond, M. Allaire, I.R. Nabi, P. Tijssen, 2001. «*A Viral Phospholipase A₂ is Required for Parvovirus Infectivity*». Developmental Cell. Vol. 1, no. 2, p. 291-302.

ZÁDORI, Z., J. Szelei, P. Tijssen, 2005. «*SAT: a Late NS Protein of Porcine Parvovirus*». Journal of Virology. Vol. 79, no. 20, p. 13129-13138