

**STEVE FOREST**

**CARACTÉRISATION DU RÔLE DE LA RÉGION  
N-TERMINALE DE LA PROTÉINE VP2  
DU PARVOVIRUS PORCIN**

Mémoire

présenté pour l'obtention du grade de

Maitre ès science (M. sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation :

Dr François Denis (Président), INRS-IAF

Dr Marc Drolet, Université de Montréal

Dr Jean-François Laliberté, INRS-IAF

Dr Peter Tijssen, INRS-IAF

Décembre 2001

INRS – Institut Armand-Frappier

Université du Québec

## TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	II
LISTE DES TABLEAUX .....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VIII
RÉSUMÉ .....	X
INTRODUCTION .....	1
CHAPITRE I - REVUE DE LITTERATURE.....	4
1 –Généralités sur le PPV et les autres parvovirus .....	5
1.1 -Classification des parvovirus .....	5
1.1.1 -Famille <i>Parvoviridae</i> .....	5
1.1.2 -Le parvovirus porcin .....	5
Virus.....	6
1.1.2 -Le parvovirus porcin .....	7
1.2 -Propriétés biologiques.....	7
1.2.1 -Pathologie causée par les parvovirus .....	7
1.2.2 -Culture In Vitro .....	9
1.2.3 Hémagglutination .....	9
2 -La particule virale.....	10
2.1 -Le génome des parvovirus .....	10
2.1.1 -Les extrémités palindromiques .....	11
2.2 -L'organisation génomique .....	11
2.2.1 -Les unités transcriptionnelles.....	13
2.2.2 -L'épissage alternatif.....	13
2.3 -Les protéines virales.....	17
2.3.1 -Les protéines non-structurales .....	17
2.3.2 -Les protéines structurales.....	18
2.4 -La nucléocapside .....	18
2.4.1 La structure secondaire.....	20
2.4.2 -Morphologie de la capside .....	20
2.4.3 -Structure des interactions ADN-capside .....	21

<b>3 -Cycle viral et relation structure-fonction.....</b>	<b>22</b>
3.1 -Événements précoces .....	22
3.1.1 - Attachement à la cellule .....	22
3.1.2 -Entrée du virus et transport vers le noyau .....	23
3.1.3 -Rôle de la capsid e au cours des événements précoces .....	25
3.2 -Réplication du génome et expression des protéines virales .....	26
3.2.1 -Réplication du génome .....	27
3.2.2 -Synthèse des protéines virales .....	28
3.2.3 -Implication de la capsid e .....	28
3.3 -Assemblage des capsid es et sortie du virus .....	28
3.3.1 -Transport des protéines structurales au noyau et assemblage .....	29
3.3.2 -Encapsidation du génome et lyse cellulaire .....	30
3.4 -Autres relations structure-fonction .....	30
3.4.1 -Propriétés antigéniques .....	30
3.4.2 Hémagglutination .....	31
<b>4 -La protéine VP3 et la région unique de VP2 .....</b>	<b>32</b>
4.1 -La protéine VP3 chez les parvovirus .....	32
4.1.1 -La maturation des VP2 en VP3 .....	33
4.1.2 -Propriétés structurales et signification biologique .....	34
4.2 -Cadre de lecture alternatif .....	37
4.2.1 -Mécanismes d'initiation de traduction et ARNm bifonctionnels .....	37
4.2.2 -Exemples d'ARN bicistroniques chez d'autres virus .....	38
<b>CHAPITRE II - METHODOLOGIE .....</b>	<b>40</b>
<b>1 -Généralités .....</b>	<b>41</b>
1.1 -Gels d'agarose .....	41
1.2 -Gels de polyacrylamide .....	41
1.3 -Coloration au bleu de Coomassie .....	42
1.4 -Transfert sur membrane de PVDF .....	43
1.5 -Culture cellulaire .....	43
<b>2 -Séquençage de la protéine VP3 .....</b>	<b>44</b>
2.1 -Production du virus .....	44
2.2 -Récolte du virus .....	44
2.3 -Purification sur coussin de saccharose .....	45
2.4 -Digestion du virus par la trypsine et migration sur gel de polyacrylamide ....	46
2.5 -Séquençage de VP3 .....	46
<b>3 -Construction des mutants .....</b>	<b>46</b>
3.1 -Réactions d'amplification .....	47
3.2 -Transformation des bactéries .....	50
3.3 -Mini-préparation rapide d'ADN (UFX) .....	50
3.4 -Identification des mutants par séquençage .....	51

3.5 -Sous-clonage dans pN2.....	52
3.6 -Électroporation des bactéries .....	53
3.7- Sélection des clones .....	54
<b>4 -Analyse des phénotypes des mutants.....</b>	<b>54</b>
4.1 -Transfection des cellules PT .....	54
4.2 -Immunofluorescence sur cellules transfectées ou infectées .....	55
4.3 -Préparation des stock de mutants .....	55
4.4 -Titration des solutions stock.....	56
4.5 -Détermination des équivalents génomiques des solutions stock .....	56
4.6 -Cinétique d'infection virale .....	57
4.7 -Infections combinatoires .....	58
4.8 -Test d'effet cytopathique.....	58
<b>CHAPITRE III - RESULTATS .....</b>	<b>60</b>
<b>1 -Séquençage de la région N-terminale de la protéine VP3.....</b>	<b>61</b>
1.1 -Contenu protéique de la préparation de particules virales .....	61
1.2 -Analyse de la séquence de la bande numéro 2.....	61
<b>2 -Les mutants de délétion .....</b>	<b>62</b>
2.1 -Phénotype de transfection .....	65
2.2 -Infectivité des mutants.....	65
<b>3 -Cadres de lecture des différents parvovirus.....</b>	<b>70</b>
3.1 -Organisation des cadres de lecture .....	70
3.2 -Comparaisons de séquence entre les peptides.....	72
<b>4 -Les mutants M01, MSER et MZ8.....</b>	<b>74</b>
4.1 -Caractérisation des stocks de virus .....	75
4.2 -Cinétique d'infection par immunofluorescence .....	77
4.3 -La cinétique d'infection en titrage .....	79
4.4 -Infections combinées.....	93
4.5 -Effet cytopathique .....	93
<b>CHAPITRE IV - DISCUSSION.....</b>	<b>95</b>
<b>1 -Portion unique et maturation de VP2.....</b>	<b>96</b>
1.1 -Séquençage de l'extrémité N-terminal de VP3 .....	96
1.2 -Mutants de délétions .....	99

<b>2 -Cadre de lecture alternatif et protéine X.....</b>	<b>100</b>
2.1 –Caractérisation du cadre de lecture alternatif et de la protéine X.....	100
2.2 –Phénotype des mutants .....	101
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>106</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>109</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>111</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Membres du genre Parvovirus	6
Tableau II	Résidus de la capsid de divers parvovirus reconnus pour leur implication dans les fonctions biologiques du virus	27
Tableau III	Virus de mammifères produisant deux protéines à partir d'un seul ARNm en utilisant deux codons de départ dans des cadres de lecture différents	39
Tableau IV	Description des mutants construits	48
Tableau V	Séquence des amorces utilisées pour la mutagenèse	49
Tableau VI	Comparaison des cadres de lecture principaux et alternatifs pour différents parvovirus	71
Tableau VII	Caractérisation des stocks de mutants et virus sauvage	78
Tableau VIII	Observations au cours de la cinétique d'infection pour les mutants M01, MSER et MZ8 en parallèle avec la souche sauvage (MOI de $2,5 \times 10^{-3}$ )	82
Tableau IX	Observations au cours de la cinétique d'infection pour les mutants M01, MSER et MZ8 en parallèle avec la souche sauvage (MOI de $2,5 \times 10^{-2}$ )	84
Tableau X	Titration des surnageants recueillis lors de la cinétique d'infection	92
Tableau XI	Comparaison de l'effet cytopathique causé par le virus sauvage et les virus mutants à différents temps post-infection à haute MOI	94

## LISTE DES FIGURES

Figure 1	La particule virale et génome du PPV	12
Figure 2	Organisation de l'information génétique chez le parvovirus porcin	16
Figure 3	Structure secondaire de la portion commune des protéines de capsides du CPV	19
Figure 4	Schéma représentant les combinaisons d'infections lors du test d'infections combinatoires	59
Figure 5	Electrophorese sur gel de polyacrylamide avec SDS d'un échantillon de la préparation virale	64
Figure 6	Rapport de séquençage de la portion N-terminale de la protéine VP3	64
Figure 7	Observations en microscopie a fluorescence de cellules PT non transfectées et transfectées avec le mutant M0	67
Figure 8	Observations en microscopie a fluorescence de cellules PT transfectées avec les mutants $\Delta 10$ et $\Delta 15$	69
Figure 9	Alignements de séquences paralleles de la protéine X et de la protéine VP2 entre divers parvovirus	73
Figure 10	Quantification des équivalents génomiques par PCR quantitatif	77
Figure 11	Immunofluorescence des clones infectieux pN2, M01, MSER et MZ8 20 heures post-infection	85
Figure 12	Immunofluorescence des clones infectieux pN2, M01, MSER et MZ8 30 heures post-infection	87
Figure 13	Immunofluorescence des clones infectieux pN2, M01, MSER et MZ8 40 heures post-infection	89
Figure 14	Courbe de répliation virale de pN2 et des mutants M01, MSER et MZ8	92

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

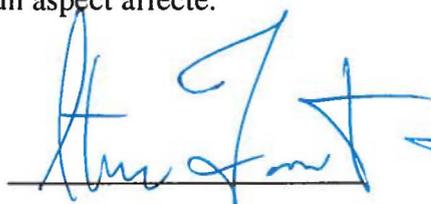
aa	:	Acide aminé
AAV	:	Virus associé a l'Adénovirus
ADN	:	Acide déoxyribonucléique
ARN	:	Acide ribonucléique
ARNm	:	ARN messenger
ATCC	:	American Type Culture Collection
ATP	:	Adénosine triphosphate
BPV	:	Parvovirus Bovin
BSA	:	Albumine sérique bovine
CAPS	:	Acide 3-[cyclohexylamino]-l-propanesulfonique
CPV	:	Parvovirus canin
CsCl	:	Chlorure de césium
Da	:	Dalton
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	:	Ethylènediaminetétraacétate
FITC	:	Fluorescéine isothiocyanate
FPV	:	Parvovirus félin
H-1	:	Parvovirus Toolan du Rat
HA	:	Hémagglutination
LPV	:	Parvovirus du lapin
MEV	:	Virus de l'entérite du vison
MOI	:	Multiplicité d'infection
MVM	:	Minivirus de la souris
NS	:	Non-structurale (protéine du parvovirus, ex: NS1)
PBS	:	Tampon phosphate salin
PCR	:	Réaction de polymérase en chaine
PT	:	Testicules porcine (lignée cellulaire)

PPV	:	Parvovirus porcin
PVDF	:	Difluorure de polyvinylidene
RPM	:	Rotation par minute
RV	:	Parvovirus Kilham du rat
SDS	:	Dodécylsulfate de sodium
ST	:	Testicule de porcelet (lignée cellulaire)
UFF	:	Unité formant un foyer de fluorescence
VP	:	Protéine structurale ( protéine du parvovirus, ex: VP1)

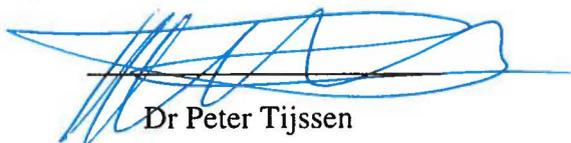
## **RÉSUMÉ**

Les connaissances chez le parvovirus porcin et les autres parvovirus ont beaucoup progressé au cours des dernières années, notamment en raison de l'analyse de la structure de certains parvovirus par cristallographie à rayon X. Toutefois, les relations entre les éléments structuraux de la capsidie et les fonctions biologiques du virus sont encore relativement peu connues, particulièrement en ce qui a trait à la région N-terminale de la protéine VP2. Cette région, très conservée chez tous les parvovirus, correspond à la portion qui est clivée chez les membres du genre Parvovirus lors de la maturation protéolytique de VP2 en VP3. La signification biologique de cette maturation est toujours inconnue.

Nous démontrons ici, par une approche de mutagenèse dirigée, que la portion N-terminale de VP2 est très importante lors du cycle infectieux du virus. Les mutations de délétion réalisées ont pour effet d'anéantir complètement l'infectivité du virus. Nous avons également identifié dans la région du génome codant pour la portion N-terminale de VP2, un segment qui pourrait constituer un court cadre de lecture supplémentaire. Les caractéristiques de ce cadre de lecture sont bien conservées chez plusieurs autres membres du genre Parvovirus et la séquence anticipée de la protéine présente aussi un degré d'homologie intéressant parmi ces virus. Toutefois, aucun ARNm viral ne semble en mesure d'exploiter ce cadre de lecture alternatif, ce qui porte à croire que des mécanismes permettant l'utilisation d'ARNm bicistroniques sont impliqués. La mutagenèse dirigée modifiant le contexte d'initiation aux différents codons de départ ou bloquant la production de cette protéine alternative, surnommée protéine X, se traduit par une modification du phénotype lors de la réplication virale, mettant ainsi en évidence un lien entre ce cadre de lecture et une fonction biologique du virus. Les premiers résultats quant à déterminer le mode d'action de cette protéine virale indiquent que la lyse cellulaire serait un aspect affecté.



Steve Forest



Dr Peter Tijssen

# **INTRODUCTION**

Le parvovirus porcin (PPV) est associé au syndrome S.M.E.D.I., un regroupement de manifestations cliniques importantes incluant la mort à la naissance (Stillbirths), la momification des fœtus (Mummified fetuses), la mort de l'embryon (Embryonic Death) et l'infertilité (Infertility). Le PPV est omniprésent dans la presque totalité des élevages porcins dans le monde et représente une menace économique importante pour les éleveurs. Jusqu'à maintenant, le seul moyen utilisé pour lutter contre le PPV est la vaccination. Le risque d'infection de l'homme par le PPV est négligeable en conditions normales, toutefois les organes porcins utilisés pour les xéno-transplantations pourraient servir de plate-forme au PPV pour s'adapter à l'humain ce qui soulève une préoccupation à cet égard.

Les connaissances sur la biologie des parvovirus sont limitées plus particulièrement chez le parvovirus porcin. Une meilleure connaissance des relations structure-fonction, entre autres, permettra de désigner des cibles adéquates pour la mise au point de nouveaux vaccins et d'agents anti-viraux. De plus, les connaissances acquises chez le PPV sont potentiellement applicables chez les parvovirus d'autres espèces y compris l'humain.

Un des aspects parmi les moins étudiés de la biologie des parvovirus est la région unique de VP2 et le procédé par lequel elle est clivée *in vivo* et *in vitro* pour donner naissance à VP3. Nous avons réussi à identifier, par séquençage direct de la protéine VP3, des séquences qui pourraient correspondre à l'extrémité N-terminale de VP3. La construction de mutants de délétion de VP2, dont un en particulier imite la protéine VP3, a démontré l'importance de cette région pour l'infectivité du virus.

Nous avons également mis en évidence un cadre de lecture n'ayant jamais été documenté dans la littérature des parvovirus. Ce cadre est présent dans la région du génome codant pour la portion N-terminale de VP2 mais est déphasé par rapport au cadre principal. Chez le PPV, ce cadre a le potentiel de coder pour un peptide de 68 acides aminés. Nous avons aussi découvert que ce cadre pouvait également être présent chez

plusieurs autres parvovirus. Une autre approche de mutagenèse a été utilisée pour moduler l'expression de cette protéine baptisée X. Les phénotypes qui ont découlé de la construction des mutants confirment que cette protéine joue un rôle dans la réplication du virus, à un stade tardif du cycle, probablement lors de la lyse cellulaire.

# **CHAPITRE I**

## **REVUE DE LITTERATURE**

## 1 –Généralités sur le PPV et les autres parvovirus

### 1.1 -Classification des parvovirus

#### 1.1.1 -Famille *Parvoviridae*

La famille des *Parvoviridae* regroupe des virus ayant un génome d'ADN simple brin linéaire. Leur capsid de symétrie icosaédrique est non enveloppée. Les parvovirus sont parmi les plus petits virus d'animaux avec un diamètre variant entre 20 et 25 nm (Fields, Knipes, Howley, 1996; Cotmore, 1987).

La classification des membres de la famille des *Parvoviridae* a été récemment modifiée. Selon l'International Committee on Taxonomy of Viruses (Van Regenmortel *et al.*, 2000), les *Parvoviridae* sont maintenant séparés en deux sous-familles : les *Densovirinae*, infectant des hôtes invertébrés et les *Parvovirinae*, infectant les vertébrés. On retrouve trois genres chez les *Parvovirinae* : *Dependovirus*, *Erythrovirus* et *Parvovirus*. Les *Dependovirus* sont associés à un autre virus comme l'Adenovirus ou l'Herpesvirus dont ils dépendent pour se répliquer. Le genre *Erythrovirus* comporte des parvovirus autonomes comme le B19, le V9 et le SPV. D'autres virus autonomes de vertébrés sont rassemblés dans le genre *Parvovirus* dont fait partie le Parvovirus Porcin (PPV). Les autres membres de ce genre sont présentés au tableau I. La sous-famille *Densovirinae* est aussi divisée en trois genres : *Densovirus*, *Iteravirus* et *Brevidensovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000).

#### 1.1.2 -Le parvovirus porcin

On retrouve plusieurs souches de PPV pouvant être divisées en 4 groupes selon leur propriétés pathogéniques qui seront élaborées plus en détails dans la prochaine section. Les souches non-pathogènes sont KBSH et NADL-2, cette dernière étant utilisée comme vaccin atténué (Molitor, Joo, 1990) ; les souches pathogènes pour les foetus non-immunocompétents : NADL-8 et IAF-76 ; les souches pathogènes aux foetus

immunocompétents causant en plus des dermatites : Kresse et IAF-54 ; et finalement, le quatrième groupe comprend les souches entériques (Tijssen *et al.*, 1995).

Le PPV, MVM, CPV, FPV, MEV, virus RV et virus H-1 sont beaucoup plus proches que les autres parvovirus dans le genre Parvovirus (Bergeron, Hébert, Tijssen, 1996) et sont cités à quelques reprises dans la littérature (Wu, Rossmann, 1993 ; Tattersall, Cotmore, 1988 ; Chapman, Rossmann, 1993) comme étant le groupe semblable au virus de rat (groupe RV-like). Bien que ce regroupement ne soit aucunement officiel, l'appellation sera quand même utilisée dans le présent mémoire par souci de concision.

**Tableau I : Membres du genre Parvovirus**

Virus	Hôte	Acronyme
Virus de la maladie aléoutienne du vison	vison	AMDV
Parvovirus bovin	bœuf	BPV
Minivirus du chien	chien	CMV
Parvovirus canin	chien	CPV
Parvovirus félin	chat	FPV
Parvovirus de l'oie	oie	GPV
Parvovirus HB	homme ?	HBPV
Parvovirus Toolan du rat	rat	H-1PV
Parvovirus Kilham du rat	rat	KRV
Parvovirus du lapin	lapin	LPV
LuIII	inconnu	LUIIIIV
Virus de l'entérite du vison	vison	MEV
Minivirus de la souris	souris	MMV
Parvovirus porcin	porc	PPV
Parvovirus du raton	raton	RPV
Parvovirus RT	rat	RTPV
Virus de la tumeur X	inconnu	TVX

(Siegl, 1984; Van Regenmortel *et al.*, 2000)

### **1.1.2 -Le parvovirus porcin**

On retrouve plusieurs souches de PPV pouvant être divisées en 4 groupes selon leur propriétés pathogéniques qui seront élaborées plus en détails dans la prochaine section. Les souches non-pathogènes sont KBSH et NADL-2, cette dernière étant utilisée comme vaccin atténué (Molitor, Joo, 1990) ; les souches pathogènes pour les foetus non-immunocompétents : NADL-8 et IAF-76 ; les souches pathogènes aux foetus immunocompétents causant en plus des dermatites : Kresse et IAF-54 ; et finalement, le quatrième groupe comprend les souches entériques (Tijssen *et al.*, 1995).

Le PPV, MVM, CPV, FPV, MEV, virus RV et virus H-1 sont beaucoup plus proches que les autres parvovirus dans le genre Parvovirus (Bergeron, Hébert, Tijssen, 1996) et sont cités à quelques reprises dans la littérature (Wu, Rossmann, 1993 ; Tattersall, Cotmore, 1988 ; Chapman, Rossmann, 1993) comme étant le groupe semblable au virus de rat (groupe RV-like). Bien que ce regroupement ne soit aucunement officiel, l'appellation sera quand même utilisée dans le présent mémoire par souci de concision.

## **1.2 -Propriétés biologiques**

### **1.2.1 -Pathologie causée par les parvovirus**

Les effets pathologiques des parvovirus reflètent bien leur dépendance envers des cellules en division active. En effet, la réplication des parvovirus nécessite certaines fonctions de la cellule hôte qui sont exprimées uniquement lors de la phase S ou au début de la phase G2 du cycle cellulaire (Tennant, Layman, Hand, 1969 ; Tattersall, 1972 ; Rhode, 1973). Les effets de l'infection *in vivo* sont principalement tératogènes (Siegl, 1984), les foetus étant plus susceptibles en raison du grand nombre de tissus en développement.

Chez le PPV, ces effets sont regroupés par le syndrome SMEDI observé chez le porc dans les années soixante (Dunne et al., 1965), bien que l'identification du PPV comme agent causal n'ait eu lieu qu'en 1975 (Mengeling, Cutlip, 1975 ; Joo, Donaldson-Wood, Johnson, 1976). Ce syndrome inclut des problèmes tels que la mort à la naissance, la momification des fœtus, la mort embryonnaire et l'infertilité. Le virus doit causer une virémie chez une truie séronégative pour atteindre le fœtus. La nature des symptômes varie selon le moment de la grossesse où la mère est infectée. Pendant les 21 premiers jours, la mort au stade embryonnaire résultera en la résorption de l'embryon. Si l'infection de la truie gestante survient plus tard, il y aura plutôt momification du fœtus. Le PPV produira peu d'effets cliniques si l'infection du fœtus survient après que ce dernier ait atteint l'immunocompétence, c'est-à-dire aux alentours de 70 jours. Comme le virus prends environ 15 jours pour causer une virémie chez la mère et traverser la barrière placentaire, l'infection de la truie devra se faire avant 55 jours pour atteindre le fœtus avant sa compétence immunitaire (Mengeling, Cutlip, 1975 ; Joo, Donaldson-Wood, Johnson, 1976; Molitor, Joo, 1990). La souche Kresse, plus virulente, constitue une exception en étant capable d'affecter les fœtus même après 70 jours de gestation. (Choi *et al.*, 1987).

Jusqu'à maintenant, la vaccination est le principal outil utilisé pour combattre les infections au PPV. Des vaccins atténués (NADL-2) et des souches virulentes inactivées ont démontré leur efficacité à établir une immunité protectrice contre l'infection (Molitor, Joo, 1990).

Comme pour le PPV, les problèmes reliés aux autres parvovirus autonomes sont retrouvés chez les nouveau-nés. Chez les chiots et les chatons, les nouveau-nés peuvent décéder d'infections généralisées. On retrouve aussi des symptômes mieux définis pouvant apparaître après quelques semaines: la myocardite associée au CPV et l'hyperplasie du cervelet pour le FPV. Les chats et les chiens sont aussi susceptibles à une panleukopénie au cours des quatre premiers mois de leur vie de même que des troubles entériques pouvant apparaître jusqu'à un an après la naissance. Ces deux derniers types de

symptômes sont associés avec l'activité mitotique élevée chez les cellules du système immunitaire et de l'épithélium intestinal même chez les adultes (Studdert, 1990).

### **1.2.2 -Culture In Vitro**

La majorité des parvovirus autonomes peut se répliquer de façon relativement facile *in vitro*, chacun étant capable d'infecter ses propres lignées primaires ou permanentes (Siegl, 1984). Le PPV est habituellement cultivé sur des lignées permanentes provenant de tissus foetaux de porc comme les cellules SK (testicules), PK-14 (reins) (Siegl, 1984) et PT (testicules) (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993).

### **1.2.3 Hémagglutination**

La capacité de causer l'hémagglutination des globules rouges de certaines espèces animales est une caractéristique retrouvée chez la plupart des parvovirus y compris le PPV (Siegl, 1984). Il est connu que la cause de l'hémagglutination est l'adhésion des capsides virales aux résidus d'acide N-acétylneuraminique présents sur des molécules de surface des globules rouges (Barbis, Chang, Parrish, 1992). La signification biologique de cette propriété est encore incertaine. Certains résultats montrent qu'elle est reliée au processus d'infection (Barbis, Chang, Parrish, 1992), mais les conclusions précises et solides restent encore hors de portée.

Si la signification biologique de l'hémagglutination n'est pas connue, il s'agit d'une propriété grandement exploitée en laboratoire. Le titre HA lorsque déterminé dans des conditions standardisées peut s'avérer une façon pratique de doser des capsides. Aussi, le test d'inhibition d'hémagglutination causée par des anticorps ou des antisérums est un moyen utilisé pour différencier ou identifier différentes souches de parvovirus. On peut aussi de cette façon analyser le contenu des sérums en anticorps et déceler des infections ultérieures chez un animal (Siegl, 1984).

## 2 -La particule virale

Les parvovirus sont de petits virus non-enveloppés ayant une taille variant de 20 à 25 nm de diamètre. La capside a une symétrie icosaédrique. Leur génome est constitué d'ADN simple brin linéaire d'une longueur d'environ 5 kb (Cotmore, Tattersall, 1987). Les parvovirus sont très résistants à certains traitements physiques, chimiques et enzymatiques (Arella *et al.*, 1990). Les particules demeurent infectieuses sur une large échelle de pH. On observe aussi une grande résistance à la chaleur, même pour des températures allant jusqu'à 70°C (Cotmore *et al.*, 1999). Des produits tels que le chloroforme, le tetrachlorure de carbone et différents alcools ne causent aucune altération aux propriétés des capsides et sont même utilisés dans certaines procédures de purification. Plusieurs enzymes sont également sans effets sur l'infectivité tels que la DNase, la RNase, la pepsine, la papaïne et la trypsine (Arella *et al.*, 1990).

Les particules virales infectieuses sont souvent retrouvées en deux bandes sur un gradient de chlorure de césium. La première bande correspondant à une densité de 1.41-1.43g/cm<sup>3</sup> est constituée de particules dites "pleines légères", alors que les particules formant la deuxième bande ayant une densité de 1.45-1.47g/cm<sup>3</sup> sont dites "pleines lourdes" (Clinton, Masaki, 1975; Tattersall *et al.*, 1976). Un autre type de particules est également retrouvé dans la population hétérogène d'une infection, il s'agit de particules sans génome, dites "vides", qui sont retrouvées à une densité de 1.32 g/cm<sup>3</sup> sur un gradient de chlorure de césium (Tattersall *et al.*, 1976).

### 2.1 -Le génome des parvovirus

Le génome des parvovirus est constitué d'ADN monocaténaire, linéaire et a une longueur d'environ 5 kb, 5075 nucléotides dans le cas de la souche NADL-2 du PPV (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993). La particule virale contient une seule copie de génome. Le PPV encapside le brin de polarité négative mais d'autres parvovirus peuvent encapsider l'autre brin ou un mélange des deux (Cotmore, Tattersall, 1987). La

convention veut que le génome soit représenté par rapport à l'orientation des ARN messagers (ARNm). Pour cette raison le génome de polarité négative est toujours représenté avec l'extrémité 5' à droite. (Figure 1)

### **2.1.1 -Les extrémités palindromiques**

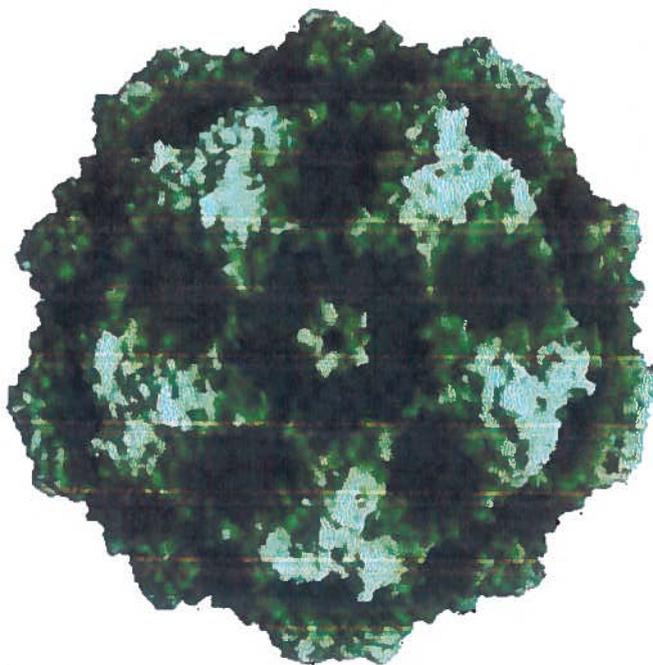
On retrouve aux extrémités du génome deux séquences relativement courtes qui peuvent former des structures secondaires bicaténares de type épingle à cheveux (Figure 1) (Bourguignon, Tattersall, Ward, 1976). Chez le parvovirus porcin, ces extrémités ont une longueur de 117 nucléotides en 3' et 220 nucléotides en 5' (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993). Contrairement aux virus du genre Dependovirus, les structures terminales du génome des parvovirus autonomes du genre Parvovirus ne sont pas des répétitions inversées mais possèdent chacune leur séquence distincte (Cotmore, Tattersall, 1987).

La comparaison des séquences de palindromes pour MVM, H-1 et RV démontre un très fort degré d'homologie, soulignant l'importance du rôle joué par ces structures secondaires (Astell *et al.*, 1979). Les séquences terminales des parvovirus sont principalement impliquées dans le processus de réplication mais peuvent aussi servir à moduler l'activité d'un des promoteurs viraux dans le cas de l'extrémité 3' (Cotmore et Tattersall, 1995).

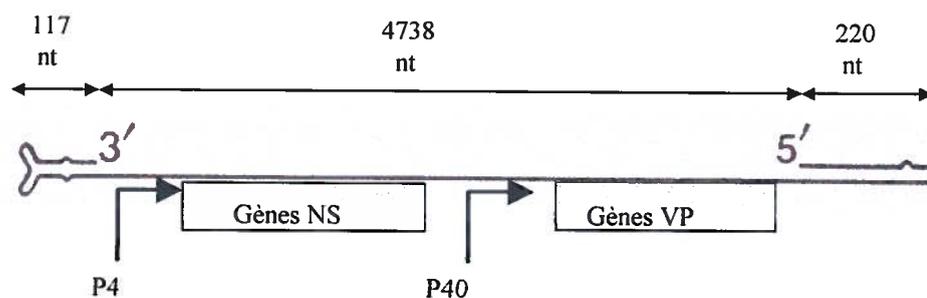
## **2.2 -L'organisation génomique**

La petite taille des parvovirus et la longueur de leur génome nécessite une utilisation optimale de leur capacité codante. Il est connu depuis longtemps que la somme des poids moléculaires des protéines virales des parvovirus excède de beaucoup cette capacité. Pour résoudre ce problème, les parvovirus utilisent des stratégies comme l'épissage alternatif, la mise en commun de longs segments de génomes ainsi que la maturation post-traductionnelle.

A)



B)



**Figure 1 : La particule virale et génome du PPV**

A) Représentation de la surface du CPV selon la cristallographie à rayon X (Droits d'auteurs de l'image: J. Sgro, 1994). B) Représentation du génome du PPV-NADL-2. Les extrémités palindromiques flanquent la portion monocaténaire qui code pour les gènes non structuraux et les gènes de capsides (VP). Deux promoteurs dirigent la transcription de ces gènes : P4 et P40.

### 2.2.1 -Les unités transcriptionnelles

On retrouve deux cadres de lecture importants chez les parvovirus, celui qui code pour les protéines non-structurales (NS) et celui qui code pour les protéines de la capsid (VP) (figure 1). Ces deux cadres de lecture sont situés dans la même orientation sur le brin positif (Cotmore et Tattersall, 1987) mais consistent en deux unités de transcription distinctes ayant chacune leur propre promoteur. Chez les parvovirus de type RV-like, le promoteur P4 régule la transcription d'un transcrite primaire contenant les deux cadres de lecture des protéines NS et le promoteur P38 (P40 chez le PPV) produit un autre transcrite primaire renfermant uniquement le cadre de lecture des séquences codant pour les protéines VP1 et VP2 (figure 2) (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993 ; Pintel *et al.*, 1995). Le promoteur P4 est constitutif, mais le promoteur P38 est transactivé par la protéine NS1 (Rhode, Richard, 1987). Une fois transactivé, P38 produit de deux à trois fois plus de transcrits que P4 (Schoborg, Pintel, 1991).

### 2.2.2 -L'épissage alternatif

La plupart des produits viraux ne proviennent pas des transcrits primaires mais plutôt de transcrits épissés. Le transcrite primaire codant pour les protéines non-structurales est produit à partir du promoteur P4 et contient deux types d'introns : d'abord, deux petits introns (figure 2A annotations a et b) se chevauchant dans la région en aval des régions codantes des protéines NS; le deuxième type d'intron est le long intron (figure 2A annotations c et d) qui couvre la majeure partie du cadre de lecture des protéines NS. Les deux petits introns sont également présents sur le transcrite primaire produit à partir du promoteur P38 servant à l'expression des protéines structurales. Chez le PPV, ces introns sont délimités par deux sites donneurs et un seul site accepteur (Figure 2B). Le premier site donneur, D1 (position 2280), est situé en aval des codons d'arrêt de NS1 et NS2 et quelques nucléotides en amont du codon de départ de VP1. Le site donneur alternatif, D2, est en aval de ce codon de départ. L'utilisation de D1 ou D2 avec le site accepteur commun, A1 (position 2386), aura pour effet d'éliminer ou de laisser en place

le codon de départ de VP1 et ainsi déterminer les quantités relatives de VP1 et VP2 (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993).

Il est important de signaler ici d'importantes différences entre le PPV et le MVM ainsi que les autres parvovirus du groupe RV-like. Ces derniers ont un deuxième site accepteur A2, ce qui a pour effet d'augmenter les combinaisons de patrons d'épissage possibles. De plus, chez ces autres parvovirus, les petits introns chevauchant sont situés à l'intérieur du cadre de lecture spécifique à NS2, donnant naissance à plusieurs isoformes de cette protéine (Pintel *et al.*, 1995). Il est d'ailleurs probable que le transcrit R3 codant pour la protéine NS3 chez le PPV compense pour l'absence d'isoformes de NS2 chez le PPV (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993).

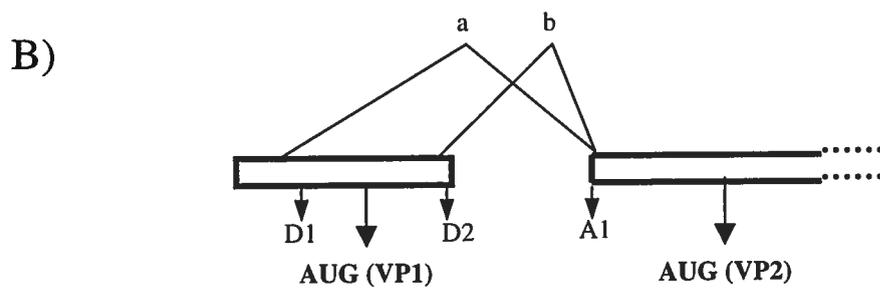
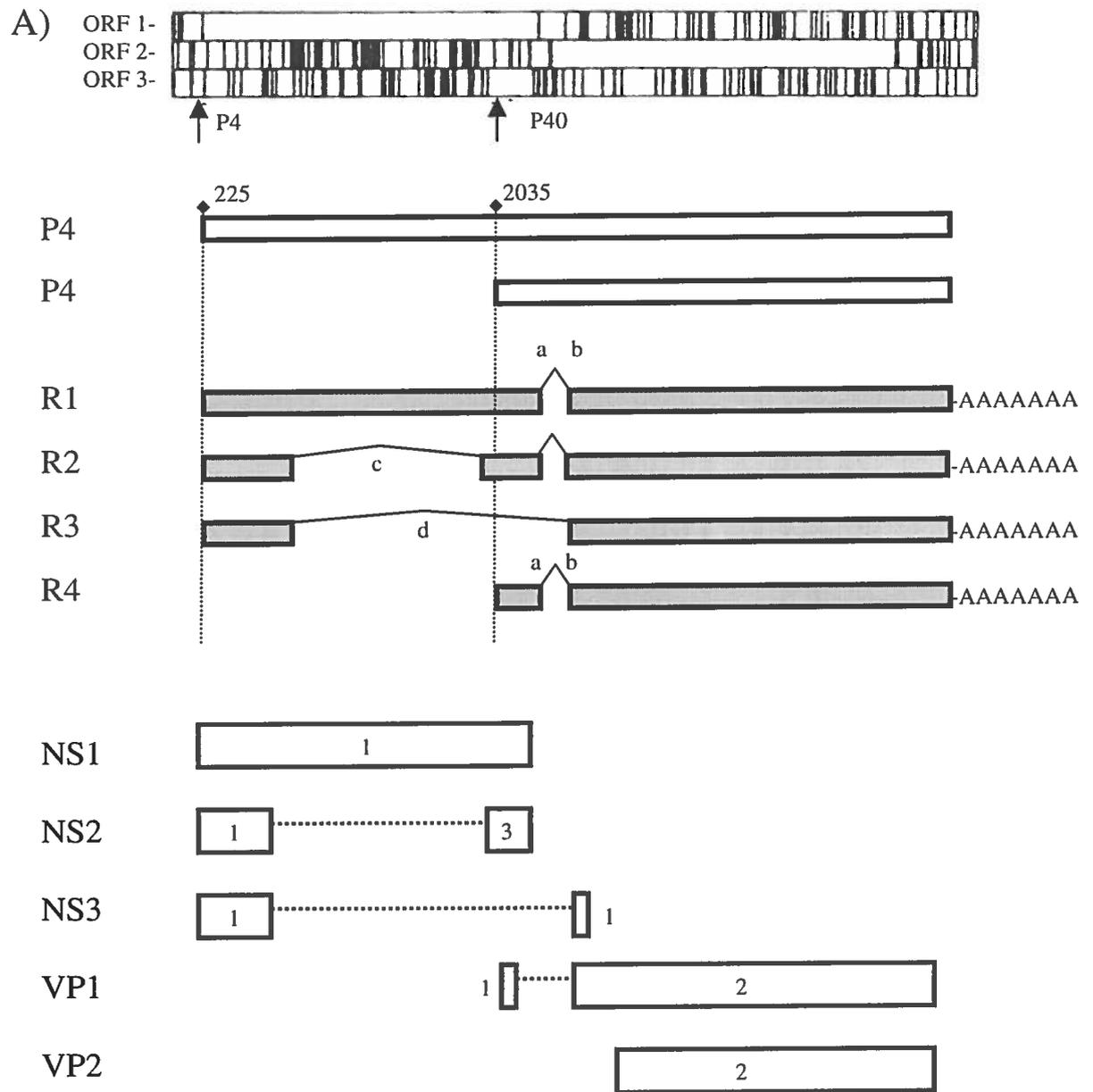
Le transcrit R1 ne nécessite aucune réaction d'épissage puisque la séquence codante de NS1 se termine avant les petits introns (Pintel *et al.*, 1995). Le transcrit R2 nécessite l'excision du grand intron pour donner la protéine NS2. De plus, le choix des sites donneurs et accepteurs pour l'épissage des petits introns détermine trois isoformes différents de cette protéine, sauf chez le PPV où il n'y a qu'une seule possibilité. Le transcrit R3, présent uniquement chez le PPV, est produit par l'utilisation du site donneur du grand intron et du site accepteur des petits introns, générant ainsi la séquence codante pour l'éventuelle protéine NS3.

Le rôle de l'épissage alternatif est, tel que mentionné plus haut, un moyen d'augmenter la capacité codante du génome, mais il s'agit aussi d'un important moyen pour moduler le niveau d'expression des protéines virales (Pintel *et al.*, 1995). Par exemple, chez le MVM, le transcrit R1 est deux fois moins abondant que R2, cette différence est directement liée au choix des sites d'épissage étant donné que la stabilité et le transport des transcrits vers le cytoplasme est équivalente (Schoborg et Pintel, 1991; Naeger *et al.*, 1992). La quantité relative de ces transcrits repose donc sur la force des sites donneurs et accepteurs d'épissage auxquels ils sont reliés.

**Figure 2 : Organisation de l'information génétique chez le parvovirus porcine.**

A) Les trois cadres de lectures sont illustrés avec les codons d'arrêt indiqués par des lignes verticales sur le schéma du haut. Les promoteurs P4 et P40 sont aussi identifiés. Les transcrits primaires et épissés sont représentés (P4, P40; R1 à R4) avec les patrons d'épissage qui mènent à leur formation (annotations « a » à « d »). Les protéines virales sont représentées en fonction des régions du génome et du numéro de cadre de lecture qui les encode.

B) Représentation des petits introns. Les patrons d'épissages « a » et « b » dépendent du choix du site donneur D1 ou D2. L'utilisation du patron « a » résulte en l'élimination du codon de départ de VP1 et l'utilisation de celui de VP2 à la place.



## 2.3 -Les protéines virales

### 2.3.1 -Les protéines non-structurales

La protéine NS1 est produite à partir du transcrit R1. Le masse moléculaire de la protéine NS1 est de 83 kDa chez le PPV (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993). La fonction de NS1 chez le PPV n'est pas déterminée. Chez les autres parvovirus, les activités de la NS1 sont variées: attachement à l'ATP, ATPase, attachement à l'ADN de manière covalente et non-covalente, hélicase et endonucléase à site spécifique (Vanacker, Rommelaere, 1995). Toutes ces activités soulignent bien son implication dans la réplication du génome viral (Cotmore, Tattersall, 1995). De plus, NS1 transactive le promoteur P38 d'où sont transcrits les gènes des protéines structurales (Doerig *et al.*, 1988). La grande homologie de la NS1 du PPV avec celles des autres membres du groupe RV-like (Tijssen, *et al.*, 1995) suggère que leurs fonctions sont semblables.

La protéine NS2 est codée par le transcrit R2. Trois isoformes différents existent chez la plupart des parvovirus autonomes selon les patrons d'épissage utilisés. Il n'y a cependant qu'une seule NS2 chez le PPV. Les fonctions de NS2 sont moins bien définies que celles de NS1. Chez les parvovirus de rongeurs, NS2 a été impliquée avec la réplication du génome (Naeger, Cater, Pintel, 1990), la régulation de synthèse des protéines virales (Li, Rhode III, 1991 ; Li, Rhode III 1993 ; Naeger, Salome, Pintel, 1993) et même l'assemblage des capsides (Cotmore *et al.*, 1999). Toutefois, le fait que plusieurs de ces caractéristiques se soient montrées dépendantes du type de cellules hôte et que certaines isoformes de NS2 soient absentes du PPV nous incitent à la prudence quant à l'extrapolation de ces fonctions chez ce dernier.

L'éventuelle protéine NS3, présente uniquement chez le PPV, serait produite par le transcrit R3. Bien que le transcrit ait été identifié et séquencé, la production de cette protéine n'a jamais été démontrée, ce qui explique par le fait même qu'aucune fonction ne

lui soit attribuée. Il est probable qu'elle soit produite pour compenser l'absence d'isoformes de NS2 (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993).

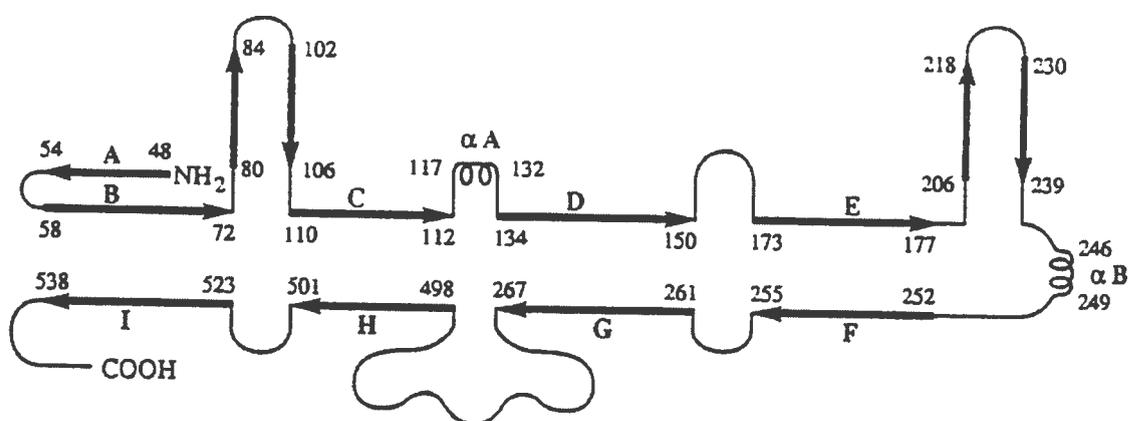
### 2.3.2 -Les protéines structurales

Chez le PPV comme chez les autres parvovirus du groupe RV-like, il y a trois protéines structurales qui forment la capsid. Pour le PPV, les masses moléculaires de VP1, VP2 et VP3 sont respectivement de 82,5, 65 et 62 kDa (Mengeling, Redpath, Vorwald, 1988). Les trois protéines partagent une même portion C-terminale et ne diffèrent que par la longueur de leur extrémité N-terminale (Tattersall, Shatkin, 1977 ; Brown, Salzman, 1984 ). La protéine VP3 est la plus courte et sa séquence est intégralement présente chez VP2 et VP1. VP2 contient une séquence additionnelle en N-terminale d'environ 20 acides aminés, il s'agit de la région couramment appelée région unique de VP2. De la même façon, VP1 contient 145 acides aminés (chez le PPV; Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993) de plus que VP2: la région unique de VP1. Alors que l'épissage différentiel est responsable de la production de VP1 ou VP2, la protéine VP3 est obtenue par maturation protéolytique de VP2 (Clinton, Masaki, 1976). Le site exact de clivage et les enzymes impliquées sont encore indéterminés. Cette maturation sera discutée en détail à la dernière section de ce chapitre. Les fonctions assumées par les protéines structurales et la capsid seront décrites en détail dans une prochaine section.

### 2.4 -La nucléocapsid

La structure de plusieurs parvovirus du groupe RV-like a été obtenue par cristallographie à rayon X. C'est le cas, entre autres, du CPV (Tsao *et al.*, 1991), du MVM (Agbandje *et al.*, 1998) et des capsides vides du FPV (Agbandje *et al.*, 1993). La structure atomique du PPV a récemment été résolue (Simpson *et al.*, 2001). La comparaison de la structure du MVM avec celle du CPV montre que la structure est très semblable malgré une homologie de seulement 50% au niveau des acides aminés (Agbandje *et al.*, 1998). Les données cristallographiques du B19 (Agbandje *et al.*, 1994) sont aussi disponibles mais il s'agit d'une espèce plus éloignée du PPV.

L'assemblage des protéines structurales VP1, VP2 et VP3 détermine la structure de la capside. Chez tous les parvovirus, cette capside est de forme icosaédrique avec une symétrie de type T=1, c'est-à-dire qu'on retrouve une quantité équivalente de protéines et d'unités asymétriques, soit 60. Elle a un diamètre d'environ 25 nm avec une masse moléculaire d'environ  $6 \times 10^6$  et  $4,0 \times 10^6$  daltons pour les capsides pleines et vides respectivement (Abgandje, Parrish, Rossmann, 1995).



**Figure 3 :** Structure secondaire de la portion commune des protéines de capside du CPV.

Les acides aminés sont numérotés selon VP2, les brins- $\beta$  sont représentés par des flèches alors que les hélices- $\alpha$  sont représentées par des spirales. Les brins formant le baril- $\beta$  sont identifiés de B à I.

### 2.4.1 La structure secondaire

Les 60 protéines de la capsidite sont formées en grande partie d'un motif baril- $\beta$  anti-parallèle comme c'est le cas pour plusieurs petits virus à ARN (Rossmann & Johnson ; 1989). Ce baril est constitué de huit brins désignés par les lettres B à I qui forment deux feuilletts (BIDG et CHEF) (figure 3). Le motif baril- $\beta$  constitue la majeure partie de la coquille de la capsidite, cependant il ne compte que pour un tiers de la structure protéique. Le reste est constitué en grande partie d'insertions entre chaque brins du baril- $\beta$ , la principale étant une boucle de 217 acides aminés entre les brins G et H. On retrouve sur les boucles d'autres structures secondaires de type hélice- $\alpha$  et baril- $\beta$  (Figure 3) ( Tsao *et al.*, 1991). Ces diverses insertions forment en grande partie la surface de la capsidite et sont associées avec plusieurs de ses fonctions biologiques (Abgandje, Parrish, Rossmann, 1995) qui seront discutées dans la prochaine section.

### 2.4.2 -Morphologie de la capsidite

L'interaction et l'assemblage des protéines structurales donnent la forme finale de la capsidite. On peut décrire de façon simple la morphologie de la capsidite en fonction des axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5. La région la plus élevée de la surface est une pointe, située sur les axes de symétrie 3, dénommée spicule. Cette élévation de 22Å par 70Å est principalement constituée par la grande boucle entre les brins  $\beta$ G et  $\beta$ H. Le long des axes de symétrie 5, on retrouve un canal cylindrique formé conjointement par les insertions entre les brins  $\beta$ D et  $\beta$ E de chacune des cinq protéines associées à cet axe. Le centre du cylindre est un canal d'environ 14 à 22 Å. Sur la surface, autour de la structure cylindrique, on observe également une dépression «canyon» d'environ 15Å de profondeur. On retrouve une autre dépression en forme de fossette sur l'axe de symétrie 2. (Tsao *et al.*, 1991 ; Abgandje, Parrish, Rossmann, 1995).

La structure des 36 premiers acides aminés en N-terminal de VP2 n'est toujours pas résolue, autant chez le CPV que le MVM (McKenna *et al.*, 1999; Xie, Chapman,

1996). Cependant, pour une unité asymétrique sur cinq, les acides aminés 28 à 37 sont situés le long du canal de l'axe de symétrie 5 (Tsao *et al.*, 1991; Abgandje *et al.*, 1993 ; Abgandje-McKenna, 1998). Ces acides aminés sont tous des glycines probablement pour conférer une certaine flexibilité et permettre le passage à travers le pore étroit. Il y aurait donc jusqu'à un cinquième des portions N-terminales de VP2 qui seraient simultanément externalisées par les 12 canaux des axes de symétrie 5. Le taux d'occupation des pores a été évalué à environ 65% (Xie, Chapman, 1996). Ce phénomène est considéré comme déterminant pour l'exposition de la région unique de VP2 aux protéases. La séquence riche en glycines est retrouvée chez tous les parvovirus.

#### **2.4.3 -Structure des interactions ADN-capside**

Certaines parties du génome sont suffisamment bien organisées pour être analysées par cristallographie. On peut retrouver 11 bases par unités asymétriques chez le CPV et jusqu'à 29 chez le MVM dont l'interaction avec la capsidie a pu être interprétée. Considérant les 60 unités, il s'agit de 13% et 34% du génome complet (Tsao *et al.*, 1991; Xie, Chapman, 1996).

### **3 -Cycle viral et relation structure-fonction**

Les événements du cycle de reproduction viral comportent une multitude d'interactions entre les composantes du virus et de la cellule hôte. Le tropisme viral et la permissivité cellulaire reposent sur plusieurs caractéristiques qui, lorsque modifiées, peuvent causer une infection non-productive ou un changement de spectre d'hôte. Chez les parvovirus, le cycle de réplication est encore relativement peu connu. Les déterminants viraux et les composantes cellulaires impliqués sont progressivement identifiés; les interactions et leur contexte sont mis à jour régulièrement.

Dans ce chapitre, les fonctions de la capsidie actuellement connues sont présentées dans le contexte du cycle viral. Les étapes du cycle indépendantes de la capsidie seront tout de même décrites brièvement. Finalement, il sera question de l'implication de la capsidie dans des propriétés des parvovirus qui sont accessoires à l'infection, telles que l'hémagglutination et les propriétés antigéniques.

#### **3.1 -Événements précoces**

##### **3.1.1 - Attachement à la cellule**

La première étape d'une infection virale est l'adsorption à un récepteur. Chez les parvovirus, peu de récepteurs cellulaires ont été identifiés catégoriquement. Les seuls récepteurs identifiés jusqu'à maintenant sont ceux de parvovirus plus éloignés du PPV, tels que le B19 se liant au globoside des cellules érythroïdes (Brown, Anderson, Young, 1993). On a aussi identifié une protéine de 67kDa à la surface de cellules félines qui serait nécessaire à l'infection par l'Aleutian mink disease parvovirus (Fox, McCrackin-Stevenson, Bloom, 1999). Des expériences d'attachement pour le CPV et le MVM ont établi qu'il y avait environ  $1-5 \times 10^5$  sites d'attachement de haute affinité par cellule de leur lignée permissive respective (Basak, Compans, 1989; Linser, Brunning, Armentrout, 1977). Certains parvovirus comme le CPV et le MVM se lient à l'acide sialique. On sait

que ce résidu est impliqué dans le processus infectieux du MVM puisqu'un traitement à la neuraminidase interfère avec l'infection (Barbis, Chang, Parrish, 1992 ; Cotmore, Tattersall, 1989). Les mutations qui compromettent l'attachement à l'acide sialique se situent dans la région de la fossette de l'axe de symétrie 2, mais aucune région de la capsid n'a été associée directement avec la liaison au récepteur (Barbis, Chang, Parrish, 1992; Tresnant *et al.*, 1995).

Pour le PPV, un anticorps monoclonal capable d'inhiber l'infection reconnaît une protéine de 40 kDa présente sur des cellules testiculaires de porc permissives, de même que sur plusieurs autres lignées non-permissives (Harding, Molitor, 1992). Il est intéressant de noter qu'une protéine de même taille réagit avec le CPV lors d'un test de recouvrement viral (Basak, Turner, Parr, 1994). Cependant aucune de ces protéines n'a été caractérisée en détail ou a été désignée comme récepteur viral.

Même si l'attachement du virus détermine est étape fondamentale dans le cycle de réplication viral et joue un rôle dans la détermination du tropisme, il semble que dans le cas du PPV il ne s'agisse pas de l'étape restrictive la plus courante (Harding, 1992). En effet, le parvovirus porcine est capable de se lier à certaines cellules sans pour autant être capable de les infecter (Ridpath, Mengeling, 1988; Oraveerakul, Choi, Molitor, 1992). De même, pour les souches MVMi et MVMp, la différence de tropisme n'est pas attribuable à une différence d'attachement à la membrane cellulaire (Previsani *et al.*, 1997, Spalholz, Tattersall, 1983).

### **3.1.2 -Entrée du virus et transport vers le noyau**

Une fois liée à son récepteur, la particule virale doit livrer son ADN au noyau. Plusieurs composantes cellulaires peuvent être impliquées durant le transport, et sont par le fait même tous des déterminants potentiels de la permissivité. Les travaux à ce sujet réalisés chez le CPV, l'AAV et le PPV indiquent que le virus chemine à travers plusieurs compartiments du système endosomal.

Il a été déterminé que le CPV pénètre dans les cellules par endocytose via des vésicules tapissées de clathrine, un procédé qui se fait rapidement, c'est-à-dire, en moins de 15 minutes (Parker, Parrish, 2000). Il semblerait que les virus transitent ensuite dans les vésicules de recyclage périnucléaires, en raison de leur colocalisation après deux heures avec la transferine, un marqueur pour ce type de compartiment. Ces vésicules de recyclage étant exemptes de protéases, cela pourrait expliquer l'observation que les capsides demeurent intactes assez longtemps après l'entrée (Parker, Parrish, 2000; Weichert *et al.*, 1998). Il ne s'agit probablement pas de la destination finale, compte tenu de certaines autres observations. En effet, le passage vers les endosomes tardifs serait requis, processus qui requière les microtubules. Cette assumption découle du fait que l'infection du virus est inhibée par le nocodazole, une drogue qui cause la dépolymérisation des microtubules (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998 ; Gruenberg, Griffiths, Howell, 1989) et par la colocalisation avec la protéine Lamp-2, qui se retrouve seulement dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Zadori *et al.*, 2001). Les résultats obtenus chez l'AAV reflètent des mécanismes semblables (Douar *et al.*, 2001). De plus, il a été démontré que l'activité phospholipase A<sub>2</sub> de la capside des parvovirus était impliquée lors du passage des endosomes tardifs/lysosomes vers le noyau (Zadori *et al.*, 2001)

L'infection par le CPV nécessite aussi l'acidification des endosomes, ce qui peut être inhibé par l'usage de NH<sub>4</sub>Cl ou de chloroquine (Basak, Turner, 1992). Même si ces drogues inhibent l'infection par le virus, il ne semble pas que ce soit la structure même de la capside qui soit affectée par le changement de pH, car la stabilité et la susceptibilité aux protéases de la particule changent peu dans l'intervalle de pH donné. Il est donc probable que l'acidification des vacuoles ne soit qu'une condition indirecte telle que l'évolution naturelle des endosomes ou l'activation des protéases (Parker, Parrish, 2000). Le transit via le système endosomal semble indispensable puisque la microinjection de particules directement dans le cytoplasme ne résulte pas en une infection productive, et ce, même lorsque les particules sont prétraitées en milieu acide. Cette dernière observation implique qu'il y aurait un élément présent dans les endosomes, autre que le bas pH, qui est nécessaire au processus infectieux (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998).

L'ADN viral, nu ou encapsidé, doit obligatoirement traverser une membrane à un moment ou un autre pour aboutir au noyau. Le mécanisme utilisé n'est toujours pas identifié. On ignore aussi si la décapsidation de l'ADN s'effectue avant, après ou simultanément à l'entrée au noyau. Des résultats obtenus chez le MVM indiquent que la décapsidation pourrait être un élément important pour la restriction de l'infection. Il a été observé que les particules de MVMi (lymphotropique) étaient déstabilisées par des extraits cellulaires de cellules permissives (EL4), alors que ce n'était pas le cas pour un virus chimérique ayant une séquence partielle codant pour les protéines de capsides de MVMp (fibrotropique). La nature de cette déstabilisation est inconnue, mais il est improbable qu'il s'agisse d'une dégradation par des protéases (Previsani *et al.*, 1997). Cette déstabilisation est possiblement un élément important de la décapsidation du génome.

### 3.1.3 -Rôle de la capsid au cours des événements précoces

Par homologie avec les rhinovirus, il est possible que le canyon autour de l'axe de symétrie 5 comprenne le site de liaison au récepteur. Cette région peut être accessible à l'éventuel récepteur mais bloque l'accès aux anticorps ce qui permet de garder cette région conservée sans craindre une répression du système immunitaire de l'hôte (hypothèse du canyon) (Tsao *et al.*, 1991; Rossmann, Johnson, 1989). Il y a toutefois peu d'études qui ont identifié des résidus critiques dans cette région chez les parvovirus.

La région du spicule sur l'axe de symétrie 3 contient quelques uns de ces résidus impliqués dans la spécificité du tropisme chez le CPV/FPV et le MVM (Abgandje-Mc-Kenna *et al.*, 1998; Chapman, Rossmann, 1993). Cette même région contient aussi des résidus contribuant à l'hémagglutination qui est souvent associée à l'adsorption (section 3.3). Toutefois, le spicule est reconnu pour son caractère immunodominant (section 3.3) et ne correspond pas aux critères établis dans l'hypothèse du canyon pour le site d'attachement au récepteur (Rossmann, Johnson, 1989; Chapman, Rossmann, 1993). Un autre site envisageable pour la liaison au récepteur est la fossette de l'axe de symétrie 2,

qui contient aussi des résidus pouvant être impliqués dans le tropisme du MVM, du FPV et également du PPV. (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998 ; Chapman, Rossmann, 1993; Vasudevacharya, Compans, 1992). Il faut cependant noter que les régions mentionnées ci-dessus n'ont pas été associées spécifiquement à l'attachement cellulaire et pourraient aussi agir lors d'autres événements subséquents. Il a d'ailleurs été montré que les différences de tropisme connues chez le groupe FPV/CPV ainsi que chez MVMp/MVMi ne concernaient pas l'adsorption (Horiuchi *et al.*, 1992 ; Spalholz, Tattersall, 1983) et pourraient résulter des interactions intracellulaires.

De façon plus générale, il a été établi que la protéine VP1 était absolument nécessaire pour former des particules infectieuses en agissant à une étape subséquente à l'adsorption et préalable à la réplication du génome (Tullis, Burger, Pintel, 1993). Cependant, pour le MVM comme pour le CPV, les déterminants allotropiques sont actifs via VP2, mêmes si ils sont également présents sur VP1 (Maxwell *et al.*, 1995; Spitzer, Parrish, Maxwell, 1997). Dans un autre ordre d'idée, un mutant de MVM ayant les acides aminés 17-23 (numérotation de VP2) délétés est déficient au niveau de l'attachement aux cellules en plus d'une inefficacité additionnelle à une étape préalable à la réplication du génome (Tullis, Burger, Pintel, 1992).

### **3.2 -Réplication du génome et expression des protéines virales**

La réplication du génome viral se produit une fois que l'ADN viral se trouve décapsidé au noyau. C'est aussi à ce moment que commence la synthèse des protéines virales, certaines étant justement impliquées dans la réplication, d'autres destinées à former les capsides de la progéniture virale. Comme la capside n'est pratiquement pas impliquée dans ces étapes et que les mécanismes en jeu sont très complexes, seules quelques grandes lignes seront exposées ici.

**Tableau II : Résidus de la capsid de divers parvovirus reconnus pour leur implication dans les fonctions biologiques du virus.**

Les résidus sont numérotés selon la séquence de VP2 sauf lors d'avis contraire. \* = Équivalent chez le PPV; \*\* = numérotation de VP1.

Espèce	Résidus	Région	Rôle	Références
CPV	93, 323	Spicule de l'axe 3	Tropisme CPV vs FPV	(Chang, Sgro, Parrish, 1992) (Spitzer, Parrish, Maxwell, 1997)
CPV	300, 301	Spicule de l'axe 3	Tropisme CPV	(Parker, Parrish, 1997)
MVM	317, 321	Spicule de l'axe 3	Tropisme MVMi vs MVMp	(Ball-Goodrich, Tattersall, 1992) (Maxwell <i>et al.</i> , 1995)
MVM	528-538	brin $\beta$ I du baril- $\beta$	Transport nucléaire	(Lombardo <i>et al.</i> , 2000)
MVM	17-23	VP2 N-terminal	Adsorption + étape précoce	(Tullis, Burger, Pintel, 1992)
PPV	348 (349 CPV*)	Fossette de l'axe 2'	Tropisme PPV	(Vasudevacharya, Compans, 1992) (Chapman, Rossmann, 1993)
PPV	378, 383, 436	Spicule de l'axe 3'	Tropisme PPV	(Bergeron, Hébert, Tijssen, 1996)
CPV	4-13** (VP1)	VP1 N-terminale	Transport nucléaire	(Vihinen-Ranta <i>et al.</i> , 1997)
CPV	323, 375, 377	Jonction fossette/spicule	Hemagglutination	(Barbis, Chang, Parrish, 1992)

### 3.2.1 –Réplication du génome

Chez les parvovirus, le génome est répliqué au noyau de la cellule hôte. Cependant, la seule présence de l'ADN viral à cet endroit n'est pas suffisant puisque, tel qu'il a déjà été mentionné, les parvovirus ne peuvent stimuler la phase S de leur cellule hôte et doivent attendre que cette dernière le fasse d'elle-même. La structure linéaire simple brin du génome des parvovirus leur confère une stratégie de réplication très particulière et leurs extrémités palindromiques jouent un rôle important dans le mécanisme. Le modèle communément proposé a été surnommé «Rolling hairpin» en raison de la structure en épingle à cheveux des extrémités et parce que le mécanisme

rappelle le cercle roulant utilisé chez les bactéries. C'est l'extrémité 3' du brin négatif qui sert d'amorce en s'appariant avec une base interne. Plusieurs intermédiaires bicaténaires ou contenant plusieurs copies du génome sont impliqués. La production de génomes simple brins individuels survient vers la fin de l'infection et dépend de la disponibilité de capsides réceptrices (Cotmore et Tattersall, 1995).

### **3.2.2 -Synthèse des protéines virales**

Les premiers gènes à être exprimés sont ceux des protéines non-structurales. Leur promoteur, P4, est activé lors de l'entrée des cellules en phase S (Deleu *et al.*, 1998). Les protéines non-structurales permettent non seulement la synthèse intensive d'ADN viral, mais NS1 active le promoteur P38 pour la synthèse des protéines structurales (Doerig *et al.*, 1988). Ainsi, tard dans l'infection, les transcrits de P38 sont plus abondants que ceux de P4 (Schoborg, Pintel, 1991).

### **3.2.3 -Implication de la capside**

Les protéines associées aux étapes de réplication et d'expression des gènes viraux sont surtout de nature non-structurale. Toutefois, Gardiner et Tattersall (1988) ont observé que la différence au niveau de la transcription entre le MVMi et le MVMp dans les fibroblastes de souris n'était observable que lorsque les cellules sont infectées et non transfectées. Ces résultats ont emmené l'hypothèse que la capside pouvait être responsable de cette différence (Gardiner, Tattersall, 1988).

## **3.3 -Assemblage des capsides et sortie du virus**

Les processus de formation des capsides, d'encapsulation des génomes et de sortie des virus sont parmi les sujets les moins documentés chez les parvovirus autonomes. Cette section résume les indices recueillis à ce sujet jusqu'à maintenant et les théories qui en découlent.

### 3.3.1 -Transport des protéines structurales au noyau et assemblage

Il est encore impossible de certifier si les protéines structurales du parvovirus sont transportées au noyau sous forme de monomères, de multimères ou de capsides déjà formées. La taille de 25 nm des parvovirus est au seuil de ce qui peut passer par le complexe de pore nucléaire (Stewart, 1992). La prédiction des forces d'interaction entre les protéines de capsides indiquent que c'est à l'axe de symétrie 3 que ceux-ci sont les plus importantes, appuyant ainsi la possibilité que les trimères soient à la base de l'assemblage des capsides (Wu, Rossmann, 1993; Lombardo *et al.*, 2000).

Une séquence agissant comme signal de localisation nucléaire a été identifiée dans la région N-terminale de la VP1 du CPV (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Une séquence impliquée dans le transport au noyau a aussi été identifiée aux positions 528 à 538 de la VP2 du MVM. Malgré que cette séquence soit nécessaire au transport nucléaire de VP2, elle n'est pas suffisante pour le transport d'une protéine hétérologue (Lombardo *et al.*, 2000), contrairement à ce qui avait été observé chez la VP1 du CPV. Toujours chez le MVM, il a été suggéré que le transport de VP2 était dépendant d'un repliement protéique adéquat alors que ce ne serait pas le cas de VP1. Il a également été démontré que VP1 collaborait au transport de protéines VP2 autrement déficientes au niveau du transport nucléaire (Lombardo, 2000). Il est possible que cette interaction entre VP1 et VP2 pour le transport vers le noyau puisse contribuer à maintenir la stoechiométrie des deux protéines dans la capside en régulant la disponibilité de ces deux protéines au noyau pour l'assemblage final.

Chez le CPV, il est possible de déléter jusqu'à un certain point la région N-terminale de VP2 sans entraver la formation des capsides vides dans le système baculovirus (Hurtado *et al.*, 1996). Ce phénomène sera discuté plus en détail à la section 4.1.2.

### **3.3.2 -Encapsidation du génome et lyse cellulaire**

La protéine VP2 du MVM s'est montrée suffisante pour la formation de capsides et l'encapsidation du génome (Tullis, 1993). Ce résultat contraste avec l'observation, faite précédemment, que l'attachement de VP1 à l'extrémité 3' du génome joue un rôle dans l'encapsidation (Willwand, 1991). Des génomes défectifs, dont l'extrémité 3' est manquante, peuvent quand même être encapsidés (Faust, 1979). De plus, la synthèse du nouveau brin serait concomitante avec l'encapsidation, augmentant ainsi les probabilités que l'extrémité 5' soit insérée en premier (Muller et Siegl, 1983; Cotmore et Tattersall, 1987).

Comme pour la plupart des autres virus non-enveloppés, les mécanismes de sortie des parvovirus sont pratiquement inconnus. Il est fort probable que cet événement dépende de la lyse cellulaire. Le virus HI est capable d'induire l'apoptose chez certaines cellules, cette activité a été attribuée aux protéines non-structurales (Rayet *et al.*, 1998). Les protéines non-structurales ont aussi été associées à la lyse de la cellule hôte (Vanacker, Rommelaere, 1995). Finalement, des mutants de la région unique de VP2 ont montré des signes possibles de déficience dans la lyse cellulaire (Tullis, Burger, Pintel, 1992).

### **3.4 -Autres relations structure-fonction**

Bien que l'hémagglutination et les propriétés antigéniques ne fassent pas partie du cycle viral, la structure de la capside joue un rôle important dans la définition de ces propriétés.

#### **3.4.1 -Propriétés antigéniques**

Les principales études sur les déterminants antigéniques ont été faites sur le CPV. Deux régions particulièrement importantes à cet effet sont situées sur le spicule de l'axe

3, la structure la plus saillante de la capside (Strassheim *et al.*, 1994). Chez le PPV, le seul peptide identifié capable de stimuler la production d'anticorps neutralisants chez le lapin est situé sur la portion N-terminale de VP2 (Karmstrup *et al.*, 1998). Un peptide de la même région chez le CPV a aussi été utilisé avec succès comme vaccin (Langeveld *et al.*, 1994).

### 3.4.2 Hémagglutination

Le rôle biologique de l'hémagglutination, s'il est nécessaire, est encore obscur. Si cette propriété permet aux capsides des parvovirus de s'attacher aux résidus d'acides sialiques présents sur les erythrocytes, la relation avec l'adsorption au véritable récepteur est incertaine. Un mutant de CPV incapable de causer l'hémagglutination des érythrocytes est tout de même aussi infectieux que la souche sauvage sur une lignée cellulaire permissive (Barbis, Chang, Parrish, 1992). D'autres mutations dans la région critique pour l'hémagglutination diminuent l'attachement aux érythrocytes mais n'affectent pas l'attachement aux cellules permissives (Tresnant *et al.*, 1995).

Malgré ces résultats démontrant la dissociation de l'hémagglutination et de l'attachement du virus à sa cellule hôte, le fait que l'acide aminé 323 de la VP2 du CPV soit à la fois impliqué dans le tropisme et l'hémagglutination laisse croire que ces deux caractéristiques ne sont pas totalement indépendantes (Chapman, Rossmann, 1993). De plus, contrairement au CPV, les particules de MVM semblent dépendre de l'acide sialique pour entrer dans leurs cellules permissives tel que démontré par un traitement à la neuraminidase inhibant la réinfection des cellules (Cotmore, Tattersall, 1989).

Il peut donc être constaté que les mécanismes impliqués dans la réplication du parvovirus sont seulement résolus de façon très partielle. De plus, la région N-terminale de VP2 n'est toujours pas associée à une fonction précise. Le clivage de cette région pour former VP3 est conservé chez tous les membres du genre Parvovirus, sous-entendant donc

une fonction importante. L'identification de cette fonction contribuera sûrement à mieux comprendre le processus de réplication des parvovirus.

## **4 –La protéine VP3 et la région unique de VP2**

La maturation de la protéine VP2 en VP3 à même la capsid virale se produit chez tous les parvovirus du genre Parvovirus. Le fait que cette caractéristique soit si bien conservée suggère fortement qu'elle soit impliquée dans une fonction importante pour la propagation du virus. Jusqu'à maintenant, les connaissances sur la protéine VP3, la région unique de VP2 et les mécanismes de maturation sont incomplètes et ne permettent pas de déterminer le rôle de cette portion de la capsid.

### **4.1 -La protéine VP3 chez les parvovirus**

La plupart des parvovirus autonomes ont trois protéines de capsid, VP3 étant obtenue par maturation protéolytique de VP2. C'est le cas de tous les virus du groupe RV dont fait parti le PPV. La seule différence entre les membres de ce groupe est une légère variation de la masse moléculaire qui peut varier entre 60 kDa et 63,5 kDa (Mengeling, Redpath, Vorwald, 1988).

Les Lapine Parvovirus (LPV) et Bovine Parvovirus (BPV) ont la particularité d'avoir quatre protéines structurales, mais il semble que leur protéine de capsid majeure soit aussi susceptible à une maturation protéolytique, du moins dans le cas du LPV. Il s'agit cependant de deux souches relativement éloignées du groupe des parvovirus de type RV-like (Cotmore, Tattersall, 1987).

L'adeno-associated virus (AAV) et le B19 sont considérablement différents des membres du genre Parvovirus. La protéine VP3 de ces virus possède un codon d'initiation qui lui est propre et aucune maturation post-traductionnelle n'a été observée pour les protéines de capsides (Carter, 1990). Il est intéressant de noter que ces deux virus ne

contiennent pas non plus la séquence riche en glycine qui jouerait un rôle important dans le processus d'exposition de la région N-terminale de VP2 aux protéases externes.

#### 4.1.1 -La maturation des VP2 en VP3

Des études chez le MVM ont indiqué que la composition des capsides en VP2 et VP3 dépendait du type de particules isolées lors de la préparation. Trois types de particules sont retrouvées à différentes densités sur un gradient de CsCl. Les particules vides, ne contenant pas d'ADN, sont retrouvées à une densité d'environ  $1.32 \text{ g/cm}^3$ . Ces particules sont constituées principalement de VP2 (~85%) et en moins grande proportion de VP1 (~15%). Les deux autres types de particules contiennent un génome mais sont quand même séparées en deux bandes distinctes : les particules pleines légères sont retrouvées à une densité de  $1.42 \text{ g/cm}^3$  alors que les particules pleines lourdes se situent à  $1.48 \text{ g/cm}^3$  sur un gradient de CsCl. Comme les particules vides, les deux types de particules pleines contiennent environ 15% de VP1 mais diffèrent quant à leur protéine majeure : VP2 pour les particules lourdes et VP3 pour les particules légères (Tattersall *et al.*, 1976 ; Clinton, Hayashi, 1975). Il a cependant été suggéré pour le parvovirus H1 de rat qu'il n'y a pas de corrélation entre le clivage de VP2 et le changement de densité mais qu'ils sont plutôt coïncidents (Paradiso, 1981).

Les particules lourdes sont principalement retrouvées dans le milieu de la culture infectée pendant les trente premières heures. Par la suite, la conversion en particules légères est progressive à mesure que les cycles de réplication augmentent jusqu'à ce que la totalité des particules soient matures (Clinton, Hayashi, 1975). Les mécanismes de cette maturation sont inconnus, il est fort probable qu'une protéase cellulaire quelconque soit impliquée. L'incubation de particules lourdes dans un milieu de culture conditionné par des cellules infectées est suffisant pour causer un changement de densité (Clinton, Hayashi, 1976).

Chez le parvovirus porcin, on observe des résultats semblables à ceux du MVM. Cependant, seules des particules vides et pleines légères ont été observées dans la population de virus obtenue par infection de foetus porcins (Molitor, Joo, Collett, 1983). Il n'est pas impossible que les particules pleines lourdes aient toutes été converties en raison du long délai entre leur formation et la récolte des virus.

La maturation naturelle de VP2 peut être imitée par l'effet de la trypsine (Clinton, Hayashi, 1976). Comme pour le clivage naturel, les particules vides sont insensibles à cette maturation. Cependant, il est établi que le site utilisé par la trypsine est différent du site naturel (Tattersall, Shatkin, 1977). De plus, la maturation artificielle causée par la trypsine ne cause pas un changement de densité chez les particules lourdes (Clinton, Hayashi, 1976).

Le site exact de clivage protéolytique qui mène à la formation de VP3 n'a été établi que pour le CPV. Le séquençage de la portion N-terminale de VP3 a indiqué que le clivage survenait après le 19<sup>ième</sup> résidu de VP2, dans la séquence : <sup>16</sup>Arg-Asn-Glu-Arg ↓ Ala-Thr-Gly-Ser<sup>23</sup> (Weichert *et al.*, 1998). Pour le MVM, il a été proposé que le site de clivage ne soit pas spécifique puisqu'une tentative de séquençage direct de l'extrémité N-terminale de VP3 a donné des séquences hétérogènes commençant juste en amont de la séquence riche en glycine (Tullis, Burger, Pintel, 1992). D'autres groupes ayant tenté le séquençage direct de VP3 ont rapporté que l'extrémité N-terminale était bloquée (Tattersall, Cotmore, 1988).

#### **4.1.2 -Propriétés structurales et signification biologique**

Les premières études comparant les propriétés des différents types de particules virales ont montré que malgré une infectivité semblable, les particules légères ayant VP3 comme peptide majeur avaient une meilleure adsorption que les particules lourdes avec une VP2 intacte (Clinton, Hayashi, 1976). Toutefois, ces résultats n'ont pas pu être répétés chez le parvovirus H1 du rat où l'infectivité est semblable d'un type de particule à

l'autre (Paradiso, 1981). Il a été avancé que si la conversion de VP2 en VP3 est nécessaire pour rendre les particules plus infectieuses, il suffisait qu'une petite proportion des protéines VP2 soient clivées (Tattersall, Cotmore, 1988). Quoiqu'il en soit, les données recueillies jusqu'à maintenant à ce sujet ne permettent pas de tirer de conclusion solide.

Les acides aminés 19 à 22 (RVER) de la protéine VP2 du MVM forment un site sensible à la trypsine (Tullis, Burger, Pintel, 1992). Il a été établi que ce site n'avait aucun rôle à jouer dans la maturation naturelle de VP2 en VP3. Cependant, la même étude a montré que ces acides aminés avaient une fonction importante dans la réplication virale puisque les mutants construits étaient déficients à former des plaques après transfection de cellules permissives. Les différences furent attribuées à une adsorption plus faible et à une autre étape non identifiée préalable à la synthèse de l'ADN viral. Aucune déficience n'a été observée au niveau de l'encapsidation et du relâchement des virus à l'exception d'un effet cytolitique anormal.

Chez le CPV, des délétions progressives en N-terminale de VP2 ont été effectuées pour vérifier l'importance de la région unique de VP2 pour la formation des capsides vides dans le système baculovirus. Il a été observé que les délétions de 9 et 14 acides aminés ne causaient pas de problèmes apparents mais que la délétion de 24 acides aminés entraînait une morphologie aberrante et la perte de certaines propriétés telles que l'hémagglutination (Hurtado *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été obtenus chez le AAV où les 28 premiers acides aminés de VP2 pouvaient être délétés sans nuire à la formation des particules vides, cependant les comparaisons avec le AAV doivent prendre en considération la distance phylogénique qui le sépare du PPV.

Toujours chez le AAV, les acides aminés 29 à 34 de la région unique de VP2 ont été identifiés comme un signal de localisation nucléaire utilisé pour transporter au noyau les protéines de capsides synthétisées dans le cytoplasme. Toutefois, la séquence <sup>29</sup>PARKRL<sup>34</sup> n'a pas d'homologue semblable chez les membres du groupe de parvovirus

RV et aucune séquence pouvant jouer le rôle de signal de localisation n'a été identifiée dans cette région de la VP2 (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997)

Du point de vue antigénique, il a été rapporté que chez le parvovirus porcin, les seuls anticorps neutralisants présents dans un antisérum de lapin étaient dirigés contre la portion N-terminale de VP2 (Kamstrup *et al.*, 1998). Des épitopes semblables ont été observés chez le CPV et le MEV. Des vaccins basés sur ces épitopes ont prouvé leur effet protecteur *in vivo* (Langeveld *et al.*, 1994 ; Langeveld *et al.*, 1995). Il semble donc que cette portion de la capsid joue un rôle important dans l'établissement de la réponse immunitaire de l'hôte. De ce point de vue, il se pourrait que les parvovirus aient évolué de façon à éliminer cette région de leur capsid par maturation.

La région unique de VP2 comporte un site important de phosphorylation chez le MVM. En effet, trois sérines situés aux positions 2, 6 et 10 de la VP2 sont phosphorylées. La mutation de n'importe quelle de ces sérines entraîne une baisse d'infectivité du virus. Il a été suggéré que la déficience survient à une étape tardive du cycle infectieux (Maroto, Ramirez, Almendral, 2000).

Il est donc évident que les connaissances sur la VP3 et la région unique de VP2 sont fragmentaires et que plusieurs autres aspects doivent être explorés avant de pouvoir dresser un tableau plus net des fonctions remplies par ces éléments de la capsid. Dans cette optique, nous tentons ici, en premier lieu, de déterminer par séquençage directe de la protéine, le site exacte de maturation de VP2 et les premiers acides aminés de VP3 chez le PPV. Par la suite, une approche de mutagenèse dirigée est utilisée sur des mutants infectieux pour créer des délétions progressives dans la région N-terminale de VP2 et ainsi obtenir des indices sur son rôle dans l'infection virale.

## 4.2 -Cadre de lecture alternatif

Lors de l'élaboration des mutants de délétions, nous avons observé qu'un petit cadre de lecture ouvert chevauchait le cadre codant pour la portion N-terminale de VP2. Le codon de départ se trouvant en aval de celui de VP2, est séparé par seulement sept nucléotides de ce dernier (AUG1234567AUG). Cependant, la caractérisation des ARN messagers du PPV ne révèle aucun transcrit pouvant exploiter ce cadre de lecture alternatif (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993). Les mécanismes d'initiation de la traduction stipulent que généralement, le codon AUG le plus près de l'extrémité 5' du transcrit est utilisé pour initier la traduction (Kozak, 1987a) or, sur tous les transcrits où le cadre alternatif est présent, un autre AUG en amont prévient l'initiation à ce site. Il semble toutefois que l'organisation du transcrit codant pour la VP2 puisse permettre la loi du premier codon d'être contournée en raison d'une séquence de Kozak non-optimale.

### 4.2.1 -Mécanismes d'initiation de traduction et ARNm bifonctionnels

Si chez les eucaryotes, la règle générale stipule que le codon AUG le plus près de l'extrémité 5' du transcrit est celui qui est utilisé pour initier la traduction (Kozak, 1987a), des exceptions bien précises ont cependant été décrites où la règle du premier codon n'est pas respectée. C'est le cas, entre autres, lorsque le cadre de lecture du premier AUG est interrompu rapidement par un codon d'arrêt, à ce moment un deuxième AUG en aval peut être utilisé par réinitiation (Kozak, 1987b). Un autre mécanisme correspond mieux à la situation du PPV : le «leaky scanning» est un phénomène où l'unité 40S du ribosome peut ignorer le premier AUG si celui-ci n'est pas dans un contexte optimal. Ce contexte optimal consiste en une séquence consensus dans l'entourage du codon AUG soit :  $G^{-6} C^{-5} C^{-4} A/G^{-3} C^{-2} C^{-1} \underline{A^{+1} U^{+2} G^{+3}} G^{+4}$ . L'adénine en position - 3 est la base la plus conservée et celle dont le rôle est le plus important pour l'efficacité de l'initiation, la guanine peut aussi être présente à condition qu'une guanine soit également présente en position +4. Cette guanine en position +4 a une importance moindre, quoique considérable, pour le contexte d'initiation. Les autres bases jouent un rôle mineur lorsque les deux conditions

ci-dessus sont respectées. En fait, les positions -3 et +4 sont utilisées pour qualifier un codon d'initiation de faible ou fort (Kozak, 1999 ; Kozak 1987a). C'est en présence de ces codons faibles que le «leaky scanning» peut survenir et qu'un deuxième codon AUG peut être utilisé (Kozak, 1987b).

#### **4.2.2 –Exemples d'ARN bicistroniques chez d'autres virus**

L'utilisation d'un ARN bicistronique n'est pas un phénomène exceptionnel chez les virus eucaryotes. Le tableau III résume des exemples de virus de mammifères utilisant la stratégie du leaky scanning pour l'expression de protéines sur deux cadres de lecture différents. Il faut également noter que la même stratégie est utilisée pour produire deux isoformes d'une protéine de longueurs différentes en utilisant le même cadre de lecture. Le phénomène est également présent chez des virus de plantes et même des gènes cellulaires humains (revu par Kozak, 1991).

Le cas bien documenté des protéines NB et neuraminidase (NA) du virus de l'influenza B est un exemple qui se compare bien à la situation du PPV (Shaw, Choppin, Lamb, 1983; Williams, Lamb 1989). Les codons de départ des protéines NB et NA sont séparés par seulement 4 nucléotides, celui de NB étant le premier. Les cadres de lecture sont chevauchant sur le segment d'ARN 6 et ce, sur une longueur de 292 nucléotides. Cette propriété est spécifique à l'influenza B et aucun analogue de la protéine NB n'est retrouvée chez l'influenza A (Shaw, Choppin, Lamb, 1983). Curieusement, il semble que la neuraminidase soit produite en quantité pratiquement équivalente à NB, cette dernière devant être théoriquement favorisée par la disposition des codons AUG (Williams, Lamb, 1989). Le cas de l'influenza B a aussi permis de découvrir d'autres circonstances permettant le leaky scanning: lorsque les deux codons de départ sont situés très près l'un de l'autre, les deux sont utilisés sans que le contexte du premier joue un rôle (Kozak, 1995). En fait, le codon AUG de NB n'est pas considéré comme faible. Ce nouveau contexte favorable au leaky scanning a été confirmé chez d'autres systèmes et il fut

démontré que seule une séquence consensus parfaite ou des éléments tels que des structures secondaires pouvaient empêcher le deuxième AUG d'être utilisé.

La possibilité que ce cadre de lecture alternatif joue un rôle dans le cycle viral du PPV est donc évaluée dans le présent mémoire. Tout d'abord, des comparaisons de séquences avec d'autres parvovirus permettront de constater s'il s'agit d'une caractéristique bien conservée. Ensuite, une approche de mutagenèse dirigée est utilisée pour moduler l'expression de cette protéine alternative. L'étude des phénotypes découlants de cette mutagenèse nous permettra de mieux cerner les fonctions possibles de l'éventuel produit viral.

**Tableau III : Virus de mammifères produisant deux protéines à partir d'un seul ARNm en utilisant deux codons de départ dans des cadres différents de lecture.**

Virus	Produits
Influenza B	Glycoprotéines NB et NA
Virus de Sendai	Protéines P et C
Reovirus S	Protéines $\sigma 1$ et 14K
Bunyavirus	Protéines N et NS <sub>S</sub>
Adenovirus	Protéines 21K et 55K
Adenovirus	Protéines 6,7K et gp19K
HTLV-I	Protéines p27 et p40
VIH type I	Protéines vpu et env
Rotavirus	Protéines 28K et 11K

## **CHAPITRE II**

### **METHODOLOGIE**

## 1 -Généralités

Certaines techniques comme la culture cellulaire, les gels d'agarose et les gels de polyacrylamide ont été utilisées régulièrement au cours de ce projet de maîtrise sans subir de modifications importantes d'une fois à l'autre. Ces procédures sont décrites en détail dans cette section et ne seront que citées dans les sections suivantes. Pour toutes les manipulations décrites dans ce mémoire, l'eau utilisée est toujours distillée et déionisée sauf lorsque spécifié autrement.

### 1.1 -Gels d'agarose

Lors d'étapes impliquant la manipulation d'ADN, les produits de réaction sont vérifiés sur gel d'agarose 0,8%, sauf lorsqu'un autre pourcentage est spécifié. Le gel est préparé en dissolvant 0,8 g d'agarose (Boehringer Mannheim) dans 100 ml de TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,114% [v/v] d'acide acétique glacial). Les échantillons d'ADN sont mélangés 1:5 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 de taille, 1 µg de marqueur de poids moléculaire (1 kb ou 100 bp) (GibcoBRL) est aussi ajouté. La migration se fait pendant une heure à 100V (bloc d'alimentation modèle 250/2,5 Bio-Rad) dans un bain de TAE. Le gel est coloré par trempage dans une solution de bromure d'éthidium de 0,5 µg/ml 15 minutes. La présence de bandes d'ADN est révélée sur un trans-illuminateur UV. Les photographies de gel sont prises sur film Polapan 667 de Polaroid.

### 1.2 -Gels de polyacrylamide

L'électrophorèse de protéines est réalisée par la méthode de Laemmli (1970). Les gels de polyacrylamide 7,5% de dimensions 0,75 mm x 80 mm x 75 mm sont préparés selon la recette suivante (Ausubel *et al.*, 1994) : 3,75 ml de tampon de séparation (1,5 M Tris-HCl, 0,4% [p/v] dodecyl sulfate de sodium [SDS], pH 8.8) sont mélangés avec 7,5

ml d'eau et 3,5 ml de la solution d'acrylamide (30% [p/v] acrylamide, 0,8% [p/v] bisacrylamide). Le mélange est dégazé sous vide 15 minutes avant d'ajouter 50 µl de persulfate d'ammonium 10% (p/v) et 10 µl de TEMED (Bio-Rad). Le gel de séparation est rapidement coulé dans le moule de l'appareil Mini-Protean<sup>®</sup> II de Bio-Rad, jusqu'à ce que le niveau soit à 7,5 mm en dessous du fond des puits. Une couche d'isobutanol équilibré dans l'eau est ajoutée sur la surface du gel avant la polymérisation. Lorsque le gel est polymérisé (environ 30 minutes), le gel d'entassement est préparé comme suit: 650 µl de la solution d'acrylamide, 1,25 ml de tampon d'entassement (0,5 M Tris-HCl, 0,4% [p/v] SDS, pH 6,8) et 3,05 ml d'eau. Après avoir dégazé 15 minutes sous vide, 25 µl de persulfate d'ammonium 10% et 5 µl de TEMED sont ajoutés et le mélange est coulé sur le gel de séparation (après avoir rincé l'interface à l'eau) après avoir mis en place le peigne avec dix puits de 5 mm de largeur.

Le tampon d'échantillon 6x est ajouté aux échantillons ou à 0,75 µl (complété à 10 µl avec de l'eau) de marqueur de poids moléculaire «Broad range» (Bio-Rad) pour une concentration finale de 1x. Les tubes d'échantillons sont ensuite bouillis dans l'eau pour 10 minutes. Les échantillons sont chargés dans les puits et l'électrophorèse se fait à 200V dans la cuve contenant 250 ml de tampon d'électrophorèse avec SDS (3% [p/v] Tris base, 14,4% [p/v] glycine, 1% [p/v] SDS). La migration est arrêtée après environ 45 minutes, au moment où le front de bleu de bromophénol atteint le bas du gel. Le contenu du gel peut alors être révélé au bleu de Coomassie ou transféré sur une membrane de PVDF.

### 1.3 -Coloration au bleu de Coomassie

Après avoir détaché le gel d'entassement, le gel est coloré pendant 20 minutes dans la solution de bleu de Coomassie G-250 (0,1% [p/v] dans 40% [v/v] de méthanol et 10% [v/v] d'acide acétique). Le gel est ensuite décoloré dans la solution de décoloration (5% [v/v] d'acide acétique, 16,5% [v/v] de méthanol) pendant 1 à 16 heures en changeant la solution au besoin. Le gel peut être séché entre deux pellicules de cellophane (Rose

Scientific) en présence d'une solution de séchage avec glycérol (20% éthanol [p/v], 10% glycérol [p/v]).

#### **1.4 -Transfert sur membrane de PVDF**

Alternativement, les protéines du gel peuvent être transférées sur une membrane de difluorure de polyvinylidene (PVDF) préalablement trempée dans le méthanol. L'appareil utilisé pour le transfert est «The Panther™» de Owl Scientific. Les composantes sont empilées dans l'ordre suivant: plaque de polarité négative, trois papiers absorbant pour transfert (Schleicher & Schuell), gel, membrane de PVDF 0,2 µm «Sequiblot™ ; Qualité séquençage» (BioRad), trois papiers absorbants, couvercle de polarité positive. Les composantes se doivent d'être bien imbibées de tampon de transfert (10 mM acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique [CAPS], 10% méthanol [v/v], pH 11). Le transfert se fait à 350 mA pendant 60 minutes. La membrane peut ensuite être colorée au bleu de Coomassie, tel que décrit précédemment, ou utilisée dans un immunobuvardage.

#### **1.5 -Culture cellulaire**

La lignée de cellules PT «porcine testis» a été utilisée pour la culture de virus, la transfection avec les clones infectieux et l'analyse des phénotypes viraux. Il s'agit d'un clone de la lignée permanente ST «swine testis», des cellules de testicules de porc qui poussent en monocouche. Les cellules ont été utilisées entre les passages 200 et 225. La culture est effectuée dans le milieu «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM) complet, c'est à dire, du milieu DMEM (Gibco BRL) auquel a été ajouté 6% (v/v) de sérum foetal de veau (Gibco BRL), 1% (v/v) de solution pénicilline/streptomycine (Gibco BRL) et 2 mM de L-Glutamine (Gibco BRL). Les cellules sont incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, il s'agit des conditions de croissance normales qui seront utilisées la plupart du temps. Le passage des cellules est effectué lorsque celles-ci atteignent 100% de confluence. Après un lavage avec 10 ml de PBS, les cellules sont décollées de la paroi du

flacon (25, 75 ou 150 cm<sup>2</sup>; Corning) en les laissant en contact de 3 à 5 minutes avec 0,5 ml à 2 ml (selon la taille du flacon) d'une solution de trypsine TRL à 0,01% (p/v) (Worthington Biochemical) et EDTA 0,04% (Gibco BRL). Les cellules sont immédiatement resuspendues dans du milieu DMEM complet avant d'être utilisées pour des tests in vitro ou pour démarrer de nouvelles cultures.

## **2 -Séquençage de la protéine VP3**

Le séquençage de la portion N-terminale de la VP3 constitue le premier objectif du projet. Pour arriver à cette fin, une quantité suffisante de virus a dû être produite pour pouvoir purifier les capsides et en séparer les protéines sur gel de polyacrylamide. La procédure est décrite dans les sections qui suivent.

### **2.1 -Production du virus**

Deux flacons de 150 cm<sup>2</sup> ont été ensemencés avec  $1,3 \times 10^7$  cellules chacun en complétant le volume à 25 ml avec du milieu DMEM complet. Quatre heures plus tard, lorsque la confluence cellulaire est d'environ 80%, le virus NADL-2 (obtenu initialement de l'American Type Culture Collection, ATCC VR-742) est ajouté pour une MOI (préalablement optimisée) de 1/500. Les cellules infectées sont ensuite laissées cinq jours en conditions normales de croissance, jusqu'à ce que le feuillet cellulaire soit complètement détruit par l'effet cytopathique du virus.

### **2.2 -Récolte du virus**

La majorité du parvovirus porcine demeure accrochée aux débris cellulaires même après la lyse des cellules, ce qui résulte en une quantité négligeable de virus dans le surnageant. Les virus sont libérés lorsque les débris sont exposés à une solution de pH plus élevé et à faible concentration de sels.

La totalité du surnageant contenant les débris cellulaires est d'abord répartie dans des tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml (Sarstedt) avant d'être centrifugés 5 minutes à 14 000g. Ensuite, les culots (contenant le virus) sont récupérés et resuspendus dans un volume total de 300 µl (multiplié par le nombre de flacons initial) de tampon bicarbonate 20 mM pH 8.6. Après avoir homogénéisé au maximum, la suspension est laissée au repos une heure à température pièce en resuspendant au vortex occasionnellement. Les tubes sont à nouveau centrifugés comme précédemment et les surnageants contenant le virus sont alors récupérés. Les culots sont encore une fois resuspendus dans 300 µl de tampon bicarbonate, puis incubés dans les mêmes conditions et centrifugés tel que décrit ci-dessus. Les surnageants sont ajoutés à ceux recueillis précédemment.

### **2.3 -Purification sur coussin de saccharose**

Le coussin de saccharose permet de séparer le virus des contaminations de faible densité. Le «coussin» est constitué de tampon bicarbonate 20 mM pH 8.6 contenant 20% de saccharose pour une densité d'environ 1,08 g/cm<sup>3</sup>. Les capsides virales, d'une densité supérieure à 1.3 g/cm<sup>3</sup>, se retrouvent donc au fond du tube à centrifugation. Le coussin est construit en ajoutant premièrement 1 ml de la solution de sucrose 20% décrite ci-dessus dans un tube à ultracentrifugation de 5 ml (Beckman). Les surnageants recueillis à la section précédente sont ajoutés au dessus, puis le volume est complété à 5 ml avec le tampon bicarbonate 20 mM pH 8.6. Le tube est centrifugé dans un rotor Beckman SW50.1 avec une ultracentrifugeuse Beckman L5-50 à 45 000 RPM pendant 3 heures. Après la centrifugation, plus de 95% du virus se retrouve dans la fraction de 250 µl du fond et dans le culot tel que confirmé par test d'hémagglutination. Le culot est resuspendu dans 500 µl de tampon bicarbonate et mélangé avec la fraction du fond. Le mélange est dialysé contre 500 ml de tampon bicarbonate 20 mM pH 8.6 pendant 24 heures à 4°C en changeant le tampon une fois.

## **2.4 -Digestion du virus par la trypsine et migration sur gel de polyacrylamide**

Afin de mieux discriminer la protéine VP de VP2, un échantillon contrôle de la suspension virale dialysée à la section 2.3 a été digéré par l'action de la trypsine. L'échantillon digéré fut composé de 13 µl de la suspension virale, 2 µl de trypsine 100x (Worthington Biochemical) et 5 µl de tampon bicarbonate 20mM pH 8,6. Un contrôle de digestion contenant 5 µl (3 µg) d'albumine sérique bovine (BSA) dans le solution NaHCO<sub>3</sub>, 2 µl de trypsine 100x et 13 µl de tampon bicarbonate 20mM pH 8,6 a aussi été préparé. La trypsine a été remplacée par du tampon bicarbonate 20mM pH 8,6 pour les témoins négatifs contenant soit le virus ou la BSA. Chaque échantillon fut incubé pendant trois heures à 37°C.

Les échantillons ont été analysés sur gel de polyacrylamide (section 1.2) de 7,5%, et comparés avec le marqueur «Broad Range» (Bio-Rad) : 0,75 µl de marqueur, 9,25 µl d'eau distillée et 2 µl de tampon d'échantillon 6x. Le gel a été révélé au bleu de Coomassie (section 1.3) et séché.

## **2.5 -Séquençage de VP3**

Pour le séquençage de la VP3, l'échantillon de virus non digéré fut aussi séparé sur gel puis transféré sur une membrane de PVDF (section 1.4) colorée par la suite au bleu de Coomassie. Le séquençage a été effectué à partir de la bande sur la membrane, identifiée comme VP3, par le service de séquençage de protéines de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (Montréal). Six cycles de séquençage ont été réalisés sur l'échantillon choisi.

## **3 -Construction des mutants**

Le deuxième volet de ce projet consiste à introduire des mutations dans la région du génome codant pour la protéine VP2. L'ADN de départ est le plasmide VPi, un

plasmide pBlueScript II SK- (Stratagene) dans lequel a été insérée la séquence 2287-3664 de la région codant pour la protéine VP1/VP2 de la souche NADL-2 du parvovirus porcin. Ce fragment fut amplifié par PCR en ajoutant un site Xba I à l'extrémité 5'. La séquence a été insérée entre les sites de restriction Xho I et Bam HI de pBlueScript en utilisant le site Bgl II à la position 3664.

Les amorces utilisées pour la mutagenèse sont complémentaires entre elles et contiennent les nucléotides mutés flanqués d'au moins 15 nucléotides de chaque cotés. Les mutations créés sont décrites au tableau IV et les séquences des amorces sont inscrites au tableau V. M0 est le mutant dont le codon de départ de VP2 a été éliminé, ce mutant a été utilisé pour ensuite créer  $\Delta 10$  et  $\Delta 15$ , des mutants pour lesquels la portion N-terminale de VP2 a été raccourcie de 10 et 15 acides aminés respectivement, en déplaçant le codon de départ en aval. Les autres mutations créées visent à modifier principalement des nucléotides pouvant avoir un effet sur l'efficacité de l'initiation de traduction au codon AUG de VP2 ou l'insertion d'un codon stop dans le cadre de lecture alternatif.

### 3.1 -Réactions d'amplification

La méthode utilisée pour effectuer ces mutations est une modification du protocole fourni avec la trousse QuikChange<sup>TM</sup> (Stratagene). La synthèse des plasmides contenant la mutation a été effectuée grâce à une réaction d'amplification par cycles thermiques semblable à une réaction en chaîne de polymérisation (PCR). Il ne s'agit pas d'une amplification exponentielle puisque les molécules nouvellement synthétisées sont linéaires lorsque sous la forme simple brin. Ainsi, seules les molécules parentales circulaires peuvent servir de gabarit pour la synthèse des brins mutés.

La composition du milieu réactionnel pour l'amplification est la suivante : 1.25  $\mu$ l (125 ng) de chacune des deux amorces, 2  $\mu$ l d'ADN parental (5 ng), 1  $\mu$ l de dNTP 10 mM, 5  $\mu$ l de tampon de réaction 10X pour Pfu (Roche Diagnostic), 38.5  $\mu$ l d'eau distillée. On doit

aussi ajouter 1 µl d'enzyme Pfu (Roche Diagnostic) au moment décrit ci-dessous, pour un volume total de 50 µl. Les tubes «thin wall» (Stratagene) ont été utilisés.

**Tableau IV : Description des mutants construits**

Les nucléotides modifiés sont soulignés, les acides aminés modifiés sont entre parenthèse et leur numérotation est selon la séquence de VP2 (Méthionine = 1; aa = acide aminé)

Mutant	Modification	Changement de nucléotides / acides aminés	Matériel de départ	Amorces utilisées
M0	Inactivation du codon de départ de VP2	<sup>2810</sup> <u>ATG</u> <sup>812</sup> → <u>GTG</u> (M 1 → V)	Vpi	M02F M02R
Δ10	Délétion des 10 premiers aa de VP2	<sup>2840</sup> <u>ATT</u> <sup>2842</sup> → <u>ATG</u> (I 11 → M)	M0	M06F M06R
Δ15	Délétion des 15 premiers aa de VP2	<sup>2855</sup> <u>GAA</u> <sup>2857</sup> → <u>ATG</u> (E 16 → M)	M0	M07F M07R
M01	A en position -3 pour satisfaire séquence de Kozak	<sup>2807</sup> <u>TCA</u> <sup>2809</sup> → <u>ACA</u> (S -1 → T)	Vpi	M01F M01R
MSER	A en position - 3 sans changement d'acide aminé	<sup>2807</sup> <u>TCA</u> <sup>2809</sup> → <u>AGT</u> Aucun changement d'aa	Vpi	MSERF MSERR
MZ8	Codon stop dans le cadre de lecture alternatif	<sup>2840</sup> <u>ATTAAT</u> <sup>2845</sup> → <u>ATAAAC</u> Aucun changement d'aa	Vpi	iIIIiF iIIIiR

Les cycles thermiques à deux étapes seulement, c'est à dire l'hybridation et l'élongation à la même température, se sont avérés comme étant les conditions donnant la meilleure spécificité. La réaction consiste en une première étape de dénaturation à 95°C. La Pfu est ajoutée lorsque cette température est atteinte. Le cycle suivant est répété 25 fois : dénaturation à 95°C pour 30 secondes et élongation à 68°C pour neuf minutes et 30 secondes. La dernière étape de la réaction d'amplification est une période d'élongation supplémentaire de cinq minutes à 68°C. L'appareil reprend la température de la pièce par la suite. Le thermocycleur TOUCHDOWN™ (Hybaid) a été utilisé pour toutes les réactions de mutagenèse.

**Tableau V : Séquence des amorces utilisées pour la mutagénèse**

Amorce	Séquence (5' → 3' ; cadre de lecture principal indiqué)
M01F	CT AAT ACA AAC TCT AAC ACA ATG AGT GAA AAT GTG
M01R	CAC ATT TTC ACT CAT TGT GTT AGA GTT TGT ATT AG
M02F	CT AAT ACA AAC TCT AAC TCA GTG AGT GAA AAT GTG GAA C
M02R	G TTC CAC ATT TTC ACT CAC TGA GTT AGA GTT TGT ATT AG
M06F	CAA CAC AAC CCT ATG AAT GCA GGC ACT GAA TTG
M06R	CAA TTC AGT GCC TGC ATT CAT AGG GTT GTG TTG
M07F	CCT ATC AAT GCA GGC ACT ATG TTG TCT GCA ACA GGA AAT G
M07R	C ATT TCC TGT TGC AGA CAA CAT AGT GCC TGC ATT GAT AGG
MSERF	CA TCT AAT ACA AAC TCT AAC AGT ATG AGT GAA AAT GTG GAA C
MSERR	G TTC CAC ATT TTC ACT CAT ACT GTT AGT GTT TGT ATT AGA TG
IIIiF	CAA CAC AAC CCT ATA AAC GCA GGC ACT GAA TTG TC
IIIiR	GA CAA TTC AGT GCC TGC GTT TAT AGG GTT GTG TTG

Les cycles thermiques à deux étapes seulement, c'est à dire l'hybridation et l'élongation à la même température, se sont avérés comme étant les conditions donnant la meilleure spécificité. La réaction consiste en une première étape de dénaturation à 95°C. La Pfu est ajoutée lorsque cette température est atteinte. Le cycle suivant est répété 25 fois : dénaturation à 95°C pour 30 secondes et élongation à 68°C pour neuf minutes et 30 secondes. La dernière étape de la réaction d'amplification est une période d'élongation supplémentaire de cinq minutes à 68°C. L'appareil reprend la température de la pièce par la suite. Le thermocycleur TOUCHDOWN™ (Hybaid) a été utilisé pour toutes les réactions de mutagénèse.

Une fois l'amplification terminée, les produits sont vérifiés sur gel d'agarose (section 1.1). La taille du fragment anticipé est de 4.3 kpb. Pour s'assurer de la destruction des brins parentaux qui ne sont pas mutés, on utilise l'enzyme de restriction Dpn I (New

England Biolabs) qui coupe uniquement l'ADN méthylé. Dpn I coupe avec une grande fréquence parce qu'elle reconnaît une séquence de quatre bases dont une est méthylée ( $GA^M\downarrow TC$ ). Comme l'ADN parental a été isolé de bactéries, il est méthylé; alors que l'ADN synthétisé lors de la réaction ne l'est pas. La digestion se fait en ajoutant 1  $\mu$ l d'enzyme (10 unités) directement au milieu de réaction et en incubant une heure à 37°C.

### **3.2 -Transformation des bactéries**

L'ADN muté traité avec DpnI est utilisé pour transformer des bactéries ultracompétentes Epicurian coli XL2-blue (Stratagene). Les bactéries sont décongelées et aliquotées à raison de 40  $\mu$ l dans des tubes de polypropylène (Falcon, # catalogue 2059) prérefroidis. On ajoute aux bactéries 1  $\mu$ l d'ADN traité avec Dpn I. L'ADN et les bactéries sont mélangés doucement et incubés sur glace pour 30 minutes. On procède ensuite à un choc thermique de 30 secondes dans un bain-marie à 42°C. Les tubes sont incubés ensuite pour 2 minutes sur glace. On ajoute 0.5 ml de milieu NZY+ (10g NZ amine [hydrolysate de caséine], 5 g d'extraits de levure, 5 g NaCl, compléter à 1 L, autoclaver, ajouter 12,5 ml de  $MgCl_2$  1 M et 12,5ml de  $MgSO_4$  1 M, filtrer) préchauffé à 42°C et on incube 60 minutes à 37°C avec agitation à 250 rotations par minute (rpm). On étale par la suite 250  $\mu$ l de la culture sur une gélose LB-ampiciline (1% [p/v] de Bacto tryptone, 0,5% [p/v] d'extraits de levure, 170 mM de NaCl, 1,5% [p/v] d'agar (Difco), 100  $\mu$ g/ml d'ampiciline). Les géluses sont incubées 16 heures à 37°C.

### **3.3 -Mini-préparation rapide d'ADN (UFX)**

Cette méthode est une modification du protocole de Cormack et Somssich (1997) permettant de faire une sélection rapide de clones basée sur le patron de digestion de l'ADN par une enzyme de restriction quelconque. Des tubes de verre de 13x100 mm (Fisher) contenant 2ml de milieu LB-ampiciline liquide (sans agar) sontensemencés individuellement avec plusieurs colonies isolées provenant de la transformation précédente. Après une incubation de 16 heures à 37°C avec agitation de 250 rpm, 200  $\mu$ l

de chaque culture est transféré dans un tube de microcentrifugeuse de 1,5 ml. Ensuite, 200 µl de solution de lyse (1% [p/v] SDS, 0,2 N NaOH) est ajouté avant de mélanger par inversion du tube cinq fois. La réaction est arrêtée par l'ajout de 200 µl de solution de neutralisation (acétate de potassium 3 M, pH 5,5) et les tubes sont inversés de nouveau cinq fois. Le mélange est centrifugé cinq minutes à 16 000 g. Le surnageant est transféré à un nouveau tube de 1,5 ml contenant 500 µl d'isopropanol. Après une centrifugation de 10 minutes à 16000 g, le surnageant est remplacé par 1 ml d'éthanol 70% et le tube est centrifugé de nouveau pour 5 minutes à 16000 g. Le culot est asséché à l'air libre, puis est resuspendu dans 50 µl d'eau distillée contenant 10 µg/ml de RNase A. (Pharmacia)

La digestion de ces préparations rapides d'ADN plasmidique avec Pvu II permet d'identifier les plasmides VPi. Pour la digestion, 5 µl de solution d'ADN telle que préparée ci-dessus est mélangée à 3,5 µl d'eau, 1 µl de tampon de réaction 10x #2 (NEB) et 0,5 µl d'enzyme Pvu II (NEB ; 10 U/ µl). La réaction est incubée 90 minutes à 37°C. Le patron de digestion est vérifié sur gel d'agarose. Cette procédure est uniquement une méthode de sélection préliminaire et ne permet pas de différencier les plasmides mutés des plasmides originaux.

### **3.4 -Identification des mutants par séquençage**

Les clones choisis correspondant aux caractéristiques de VPi sont repiqués dans 6 ml de milieu LB-ampiciline liquide dans le but de faire une mini-préparation d'ADN pour le séquençage. La trousse «Plasmid Mini Kit (QIAGEN)» a été utilisée en suivant le protocole fourni par le manufacturier. Les clones ont été séquencés par le service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier avec le système ABI de Perkin Elmer. L'amorce utilisée pour identifier les mutants est PPVKR5, cette amorce permet de séquencer à partir du nucléotide 2680 de NADL-2 (région unique de VP1) jusqu'à environ 2890 (région riche en glycine). Cette région inclue toutes les mutations planifiées pour ce projet.

### 3.5 -Sous-clonage dans pN2

La réaction de mutagénèse étant effectuée dans le plasmide VPi, la portion mutée doit être sous-clonée dans le clone infectieux pN2Δ. Le vecteur pN2 est un plasmide pUC19 dans lequel a été inséré le génome complet de la souche NADL-2 du PPV au site de restriction Sma I (Bergeron, Menezes, Tijssen, 1993). Le clone pN2 a été modifié afin de rendre certains sites de restrictions uniques : un fragment de 477 paires de bases a été éliminé du vecteur entre les sites Aat II et Kpn I, faisant disparaître Eco R1 dans le site de clonage multiple. Cette version modifiée de pN2 se nomme pN2Δ.

Le plasmide VPi muté et le plasmide pN2 ont tous deux été digérés avec les enzymes Eco R1 et Kas I (positions 3590 et 2989 de NADL2 respectivement) pour obtenir les fragments compatibles. Kas I reconnaît le même site que Nar I mais ne coupe pas de la même façon (Kas I = G↓GCGCC ; Nar I = GG↓CGCC). Kas I a été préférée car elle est plus fiable. Les portions indésirables de VPi et pN2 ont été digérées en plus avec Xba I et Xho I (VPi), ainsi que Bst XI et Nco I (pN2), pour éviter la reconstitution des plasmides originaux. Les plasmides sont digérés séparément dans un volume total de 100 µl incluant 1 µg d'ADN, 10 µl de tampon #2 10x (NEB) et 1 µl (10 U) de chaque enzyme sauf Xho I (0,5 µl;10 U) et Kas I (4 µl ;16 U). Les tubes de réaction sont incubés à 37° C pendant 90 minutes. L'ADN digéré est ensuite précipité en ajoutant 10 µl d'acétate de sodium 3 M puis 250 µl d'éthanol 100%. L'ADN est centrifugé 15 minutes à 16000 g puis le culot est resuspendu dans 1ml d'éthanol 70% et recentrifugé pour 5 min à 16000 g. Le culot est asséché à l'air libre puis dissout dans 20 µl d'eau distillée.

La ligation a été effectuée avec 100 ng de fragment Vpi et 100 ng de fragment pN2 pour un rapport moléculaire d'environ 5 pour 1 respectivement. La réaction est complétée avec 2 µl de tampon pour ligase 5x, 1 µl de ligase à ADN de T4 (GibcoBRL) et de l'eau distillée jusqu'à un volume total de 10 µl. Le mélange est incubé 1 heure à température de la pièce.

### 3.6 -Électroporation des bactéries

La préparation de bactéries compétentes pour l'électroporation a été réalisée comme suit : une colonie isolée d'*Epicurian coli* Sure II (Stratagene) sur milieu LB solide (avec 12 µg/ml de tétracycline, 30 µg/ml de kanamycine) est utilisée pour ensemençer une préculture de 3 ml de milieu LB liquide avec les mêmes antibiotiques dans un tube de 15 ml qui est ensuite incubé 16 heures à 37°C sous agitation de 250 rpm. On utilise 1 ml de cette préculture pour démarrer une nouvelle culture de 1 litre de milieu LB liquide sans antibiotiques dans un Erlenmeyer de 2 litres en incubant dans les mêmes conditions qui sont décrites plus haut. Lorsque la densité optique de la culture à 600 nm se situe entre 0,5 et 1, la culture est répartie dans des tubes à centrifugation de 250 ml stériles gardés sur la glace. Les tubes sont centrifugés à 4°C pendant 15 minutes à 4 000 g dans une centrifugeuse Sorvall R5C5. Après avoir éliminé le surnageant, le culot est resuspendu dans 250 ml d'eau distillée stérile. Les suspensions sont centrifugées à nouveau dans les mêmes conditions que précédemment. Les culots sont resuspendus dans 10 ml d'eau distillée stérile et rassemblés dans un même tube avant de compléter le volume à 250 ml avec de l'eau distillée stérile. Le tube est centrifugé comme précédemment et le culot est finalement resuspendu dans 3 ml de glycérol 10% [v/v] stérile à 4°C. Le mélange est aliquoté à raison de 85 µl dans des tubes de microcentrifugeuse de 1,5 ml et congelé immédiatement à -70°C.

Le produit de ligation est introduit dans les bactéries par électroporation. Les cellules Sure II électrocompétentes sont dégelées doucement puis un aliquot de 40 µl est mélangé avec 1 µl du produit de la ligation ci-dessus. Le mélange est transféré dans une cuvette à électroporation de 1 mm (BTX) prérefroidie sur glace. L'électroporation est effectuée dans un appareil « Electro Cell Manipulator » (BTX). Par la suite, 200 µl de milieu LB sans antibiotiques sont ajoutés dans la cuvette. Après 45 minutes d'incubation à 37°C sans agitation, 100 µl du mélange sont étalés sur une gélose LB-ampiciline. La gélose est incubée 16 heures à 37°C.

### **3.7- Sélection des clones**

Une sélection des clones obtenus est effectuée par mini-préparation rapide d'ADN décrite à la section 3.4. Cependant, la digestion de l'ADN est faite par l'enzyme Hind III. Le patron de digestion est vérifié sur gel d'agarose, les clones positifs étant ceux qui ont deux bandes d'environ 3900 et 3350 paires de bases. Une mini-préparation traditionnelle d'ADN de ces clones est produite avec la trousse « Plasmid Mini Kit » (Qiagen) et l'ADN est séquencé en utilisant l'amorce PPVKR5 (voir section 3.5). Les clones dont la mutation a été confirmée, sont séquencés de nouveau en utilisant les amorces PR36, NSXcm1 et SR-3440. Le séquençage avec chacune de ces amorces permet de contrôler la séquence complète du fragment provenant de VPi et s'assurer qu'aucune mutation fortuite n'a été insérée lors du procédé de mutagenèse.

## **4 -Analyse des phénotypes des mutants**

### **4.1 -Transfection des cellules PT**

Les génomes des clones infectieux ont été introduits dans les cellules PT permissives par transfection en utilisant le réactif de transfection Superfect (Qiagen). La procédure est une modification du manuel d'utilisation du manufacturier. Les cellules sontensemencées 16 heures avant la transfection dans une plaque de 96 puits Costar® (Corning) à raison de 35 000 cellules dans 200 µl de milieu DMEM complet par puits. Le milieu réactionnel de transfection est préparé ainsi: 1 µg d'ADN du clone est dilué dans un volume total de 60 µl avec du milieu de culture DMEM sans sérum et sans antibiotiques. Après avoir vortexé, 5 µl de réactif Superfect sont ajoutés, le mélange est vortexé et incubé 10 minutes à température de la pièce. Pendant ce temps les plaques sont vidées du milieu de culture et rincées une fois avec 200 µl de PBS. Le milieu de réaction est dilué avec 900 µl de milieu DMEM complet et distribué dans 9 puits à raison de 100 µl par puits. Après 6 heures d'incubation à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>, les plaques sont vidées et rincées avec du PBS tel que décrit précédemment. Les puits sont remplis avec

200 µl de milieu DMEM complet et incubés 24 heures ou plus dans les mêmes conditions.

#### **4.2 -Immunofluorescence sur cellules transfectées ou infectées**

Le protocole d'immunofluorescence est inspiré de Li *et al.* (1996). Le milieu est retiré des puits et les cellules sont fixées avec 100 µl de tampon d'immunofluorescence (tampon IF) (Sanofi Diagnostics Pasteur) contenant 3% [v/v] de formaldéhyde pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite incubées avec 100 µl de tampon IF contenant 3% de Triton X-100 pour 30 minutes. Après avoir rincé les puits avec 200 µl de PBS, les cellules sont incubées 60 minutes avec 75 µl d'une dilution 1/50 d'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 (obtenu de l'hybridome ATCC CRL-1745), qui reconnaît la jonction VP1/VP2. Comme alternative, une dilution 1/750 d'un sérum de porc gnotobiotique infecté au PPV (obtenu de l'Agri-food Research and Development Initiative) a aussi été utilisé. Après un lavage au PBS, 75 µl du deuxième anticorps est ajouté: dilution 1/500 d'anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Pasteur Sanofi Diagnostic) pour le 3C9 et dilution 1/750 d'anti-IgG de porc couplé à la FITC (Pierce) pour le sérum de porc. L'incubation se poursuit 60 minutes à l'obscurité. Après avoir vidé les puits, la coloration des noyaux est effectuée en ajoutant 50 µl d'une solution de réactif de Hoescht 33258 (0,5 µg/ml) (Sigma). Après 10 minutes, les puits sont rincés deux fois avec du PBS. L'observation des plaques se fait avec un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800, les longueurs d'ondes utilisées sont le bloc UV-2A 330-380 nm, émission à 420 nm pour le réactif Hoescht et le bloc b-2a 450-490 nm émission à 520 nm pour l'immunofluorescence spécifique.

#### **4.3 -Préparation des stock de mutants**

Pour les mutants infectieux, un flacon de cellules PT de 150 cm<sup>2</sup> avec une confluence de 60% à 80% est infecté avec 5 µl de surnageant de transfection. Les cellules sont incubées en condition de croissance pendant 5 jours. Les débris cellulaires et le

surnageant sont récupérés dans des tubes de 50 ml et sont agités au vortex pendant une minute. Les débris cellulaires sont éliminés par une centrifugation à basse vitesse de 5 minutes.

#### **4.4 -Titration des solutions stock**

Des dilutions en série 1/10 des surnageants de virus mutants sont préparées dans du milieu DMEM complet jusqu'à la dilution  $10^{-6}$ . Les puits d'une plaque à 96 puits sont ensemencés 16 heures à l'avance avec 40 000 cellules dans 200  $\mu$ l de milieu DMEM complet par puits et incubés en conditions de croissance normales. Le milieu est retiré, puis 200  $\mu$ l de chaque dilutions sont dispensés dans les puits. Après une heure, les puits sont vidés et 200  $\mu$ l de milieu frais sont ajoutés. L'incubation est poursuivie pour 19 heures supplémentaires. Ensuite les plaques sont préparées pour l'immunofluorescence tel que décrit à la section 4.2 en utilisant l'anticorps monoclonal 3C9. Lors de l'observation au microscope, on choisit une dilution pour chaque échantillon où l'on compte entre 20 et 200 cellules infectées. Le titre est déterminé selon le nombre d'unités formant des foyers fluorescents (UFF) d'infection (cellules positives).

#### **4.5 -Détermination des équivalents génomiques des solutions stock**

La quantification du nombre de copies génomiques s'est faite par une méthode de PCR quantitatif inspirée de la trousse « MIMIC » (Clontech; Gilliland *et al.*, 1990 ; Haberhausen *et al.*, 1998). Il s'agit d'une compétition d'amplification entre les génomes viraux à quantifier et une quantité connue d'un génome semblable mais plus court comme témoin interne. L'intensité des bandes sur gel d'agarose est comparée et la concentration de copies génomiques est déterminée par régression logarithmique.

Pour quantifier le PPV, les amorces utilisées sont PPV-80 dont la séquence correspond aux nucléotides 836 à 862 de NADL2 et PPV-119b qui est complémentaire aux nucléotides 1207 à 1181. Le génome «MIMIC» a été conçu en éliminant les nucléotides

863 à 903 du génome de NADL2 cloné dans pBluescript II KS+ (Stratagene). Le fragment de PCR sauvage a une longueur de 372 pb contre 331 pb pour le «MIMIC».

Les mélanges réactionnels sont composés de 200  $\mu$ M de dNTP, 1.5 mM de  $MgCl_2$  et 1  $\mu$ M de chaque amorce. On ajoute 1  $\mu$ l de l'échantillon à quantifier et 5  $\mu$ l de «MIMIC» de concentration variable. Le milieu est complété à 50  $\mu$ l avec de l'eau à injection, 0,2  $\mu$ l de Taq polymérase (Labquip) et 5  $\mu$ l du tampon 10x de l'enzyme. Les cycles de la réaction sont: dénaturation de 5 minutes à 95°C; 35 cycles de: 95°C pour 30 secondes, 52°C pour 30 secondes, 72°C pour 50 secondes; une extension de neuf minutes à 72°C est effectuée à la fin du thermocyclage.

On analyse 5 à 10  $\mu$ l de chaque réaction sur gel d'agarose de 2% (voir section 1.1). La photo du gel est numérisée et l'intensité des bandes est évaluée avec le logiciel « ID Image analysis software » de Kodak Digital Science™. Une courbe de régression logarithmique pour les rapports d'intensité des fragments sauvage et mimic est calculée à l'aide du logiciel Excel 2000 de Microsoft™. La concentration de l'échantillon correspond à la concentration de MIMIC lorsque le logarithme du rapport des intensité est égale à 0. Le nombre de copies de génome est corrigé en tenant compte de la longueur relative des fragments amplifiés.

#### **4.6 -Cinétique d'infection virale**

La cinétique d'infection a été effectuée dans des plaques de 96 puits, une plaque étant préparée pour chaque point de contrôle. Pour chaque plaque, 4 lignes de 5 puits sont utilisées, c'est-à-dire une ligne pour chacun des quatre clones infectieux mutants. Dans chacun des puits,  $3 \times 10^4$  cellules PT dans 200  $\mu$ l de milieu DMEM complet sont ensemencées quatre heures avant l'infection pour obtenir une confluence d'environ 75%. A temps d'infection ( $t = 0$ ), le milieu est retiré et chacun des virus est inoculé à raison de 75 UFF dans deux puits, 750 UFF dans deux autres puits et en laissant un puits non infecté pour chaque clone comme témoin négatif. Le volume total de milieu d'inoculation

est de 200  $\mu$ l. Une heure plus tard ( $t = 1$ ), le milieu d'inoculation est retiré, chaque puits est lavé avec 200  $\mu$ l de PBS et 200  $\mu$ l de milieu DMEM complet est ajouté.

Les temps d'échantillonnages choisis selon des cinétiques préliminaires sont les suivants: 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 60, 66 et 72 heures. Pour chaque point d'échantillonnage, le milieu contenu dans les puits infectés par 750 UFF est récolté pour titrage ultérieur (section 3.2.4) et les cellules de chaque puits sont soumises au test d'immunofluorescence (section 3.2.2).

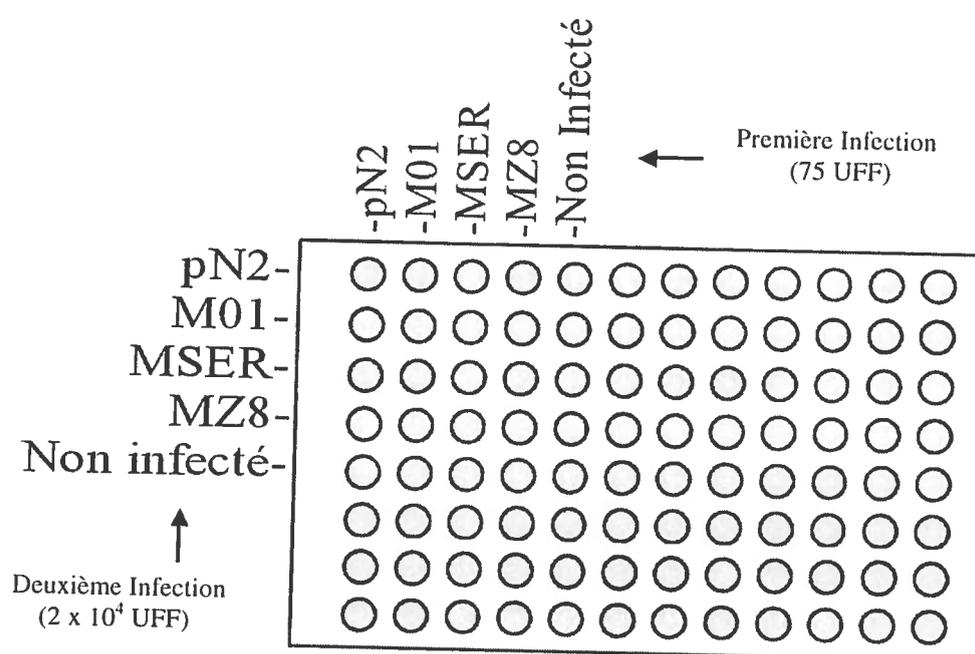
#### **4.7 -Infections combinatoires**

Les plaques de 96 puits sontensemencées avec les cellules PT de la même façon que pour les cinétiques. Une deuxième plaque est préparée comme duplicata. Quatre heures plus tard, le milieu est retiré et une rangée horizontale de 5 puits est inoculée pour chaque clone infectieux ainsi que pour le témoins négatif (figure 4). Pour chaque puits ainsi inoculé, 75 UFF sont ajoutés dans 200  $\mu$ l (au total) de milieu DMEM complet. Les puits sont lavés après 1 heure et 200  $\mu$ l de milieu DMEM complet frais sont ajoutés. Après 20 heures, la deuxième infection est effectuée en ajoutant  $1 \times 10^4$  UFF contenues dans 25  $\mu$ l directement dans le surnageant des cultures déjà infectées (figure 4). Les plaques sont incubées 20 heures supplémentaires avant d'être soumises au test d'immunoflorescence (section 3.2.2).

#### **4.8 -Test d'effet cytopathique**

Dans six plaques de 96 puits, deux rangées de cinq puits sontensemencées avec des cellules PT comme pour les cinétiques. Après avoir retiré le milieu des puits, deux puits sont inoculés avec chaque clone viral à une MOI de  $2 \times 10^4$  UFF dans 200  $\mu$ l de milieu DMEM complet). Le milieu d'inoculation est remplacé par du milieu frais après une heure. Les premières observations sont faites 24 heures post-infection: une solution de 0,2% bleu de trypan dans du PBS est utilisée pour couvrir le fond des puits d'une des

plaques et le décompte du pourcentage de cellules mortes est effectué entre deux et cinq minutes plus tard. On utilise également une plaque pour vérifier le nombre de cellules infectées par immunofluorescence (section 3.2.2). Pour les autres temps d'observation : 27, 30, 48 et 72 heures post-infection, seule le test de mortalité au bleu de trypan est effectué.



**Figure 4 :** Schéma représentant les combinaisons d'infections lors du test d'infections combinatoires.

## **CHAPITRE III**

### **RESULTATS**

## **1 –Séquençage de la région N-terminale de la protéine VP3**

### **1.1 -Contenu protéique de la préparation de particules virales**

Les protéines contenues dans la préparation virale ont été visualisées sur gel de polyacrylamide avec coloration au bleu de Coomassie (Figure 5). Trois bandes sont clairement identifiables aux positions correspondant aux tailles anticipées de VP1 (82,5 kDa), VP2 (65 kDa) et VP3 (62 kDa). Les bandes sont légèrement plus hautes que prévu, mais le contrôle de BSA non digéré a aussi migré plus lentement que sa contrepartie dans le marqueur de poids moléculaire. L'intensité des bandes respecte aussi la stoechiométrie envisagée: la bande numéro 2 est d'intensité beaucoup plus forte indiquant la protéine majeure alors que l'éventuelle bande de la protéine mineure, VP1, est considérablement plus pâle.

La première tentative de séquençage de la bande la plus basse, considérée alors comme VP3, pour l'échantillon non-traité à la trypsine a cependant révélé la séquence de la BSA. Bien que l'origine de cette contamination ne soit pas identifiée, nous avons dû reconsidérer la possibilité que les trois bandes soient VP1, VP2 et VP3. L'utilisation en immunobuvardage d'un anti-sérum de porc contre le PPV n'a pas permis d'élucider plus clairement la situation. Toutes les bandes visibles lors de la coloration au bleu de Coomassie sont également apparentes lors de l'immunobuvardage, y compris le témoin de BSA. De plus, quelques autres bandes de plus faible intensité sont également visibles à des poids moléculaire plus faibles (données non montrées). Il a alors été supposé que pratiquement toutes les protéines VP2 aient été clivées, laissant la protéine VP3 comme protéine majeure, en l'occurrence la bande #2 de la figure 5.

### **1.2 -Analyse de la séquence de la bande numéro 2**

La deuxième tentative de séquençage a donc été tentée sur la bande numéro 2 pour l'échantillon non-traité à la trypsine (figure 5). Cette fois, plusieurs signaux d'intensité

variable ont été relevés sans qu'une séquence de la BSA ne soit identifiée (figure 6). Sur le rapport de séquençage, l'intensité du signal détecté pour chaque cycle est proportionnel à la taille du caractère. La séquence de la VP2 du PPV la plus facilement conciliable avec ces données sont les acides aminés 16 à 21 (ELSATG). Chaque résidu dans cette séquence correspond au signal le plus fort ou parmi les signaux les plus forts pour chaque cycle. Une autre séquence de la VP2 pouvant aussi être reconnue est celle tout juste décalée d'un résidu en amont de la première. Les résidus 15 à 20 (TELSAT) sont effectivement reconnus mais le signal est moins fort. Aucune autre séquence de la VP2 ne peut être reconstituée intégralement à partir des résultats de séquençage, y compris la portion N-terminale (MSENVE). La présence des deux séquences consécutives suggère que le site de clivage protéolytique, responsable de la maturation de VP2 en VP3, ne serait pas absolument spécifique à un seul site dans le cas du parvovirus porcin.

## **2 -Les mutants de délétion**

Les mutants  $\Delta 10$  et  $\Delta 15$  ont été créés dans le but d'analyser le phénotype de clones infectieux du PPV dont la partie N-terminale de VP2 est raccourcie de 10 acides aminés et 15 acides aminés respectivement, cette dernière délétion correspondant à la portion clivée de façon naturelle lors de l'infection *in vitro* selon les résultats obtenus à la section 1.2. Toute la section de génome entre les nucléotides 2289 et 3590 (sites Kas I et Eco R I respectivement) a été séquencée pour s'assurer qu'aucune mutation autre que celles planifiées n'ait été introduite fortuitement.

**Figure 5 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide avec SDS d'un échantillon de la préparation virale.**

Les trois bandes présentes dans l'échantillon sont identifiées de 1 à 3. La taille des bandes du marqueur sont indiquées à droite. Le contenu des puits est le suivant :

Lignes #1, #4, #7	-Marqueur de masses moléculaires Broad Range
Ligne #2	-Échantillon de préparation virale
Ligne #3	-Échantillon de préparation virale digéré par la trypsine
Ligne #5	-BSA
Ligne #6	-BSA digéré par la trypsine

**Figure 6 : Rapport de séquençage de la portion N-terminale de la protéine VP3**

Les signaux détectés pour chaque cycle de séquençage sont indiqués, la force du signal étant proportionnelle à la taille du caractère. Les cycles numérotés de 1 à 6 représentent les six premiers acides aminés N-terminaux de la protéine correspondant à la bande #2 de la figure 5, vraisemblablement VP3.

Figure 5

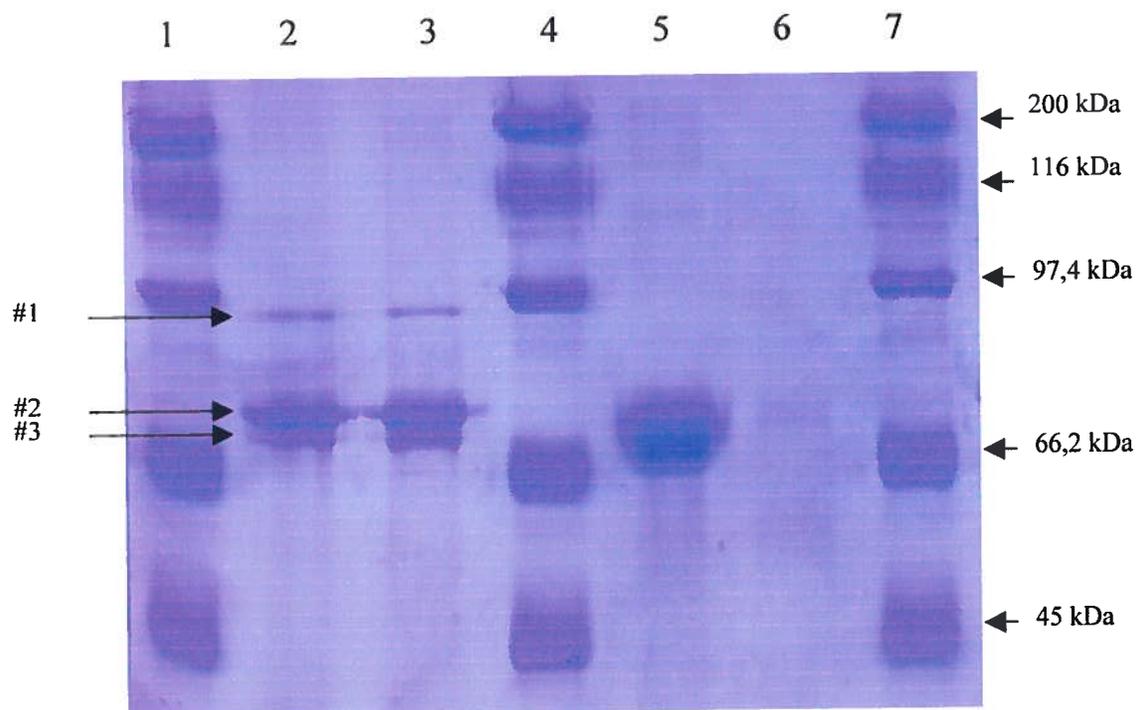


Figure 6

<b>Acides aminés observés</b>	
1	- Q, T, E, M, L
2	- E, L, F, I, A, G, S
3	- I, S, P, T, M, L
4	- A, E, Y, V, S, Q, F, L, I
5	- T, K, A, Y, P, R
6	- Q, T, G, L, A

## 2.1 –Phénotype de transfection

Après transfection des cellules PT avec l'ADN des clones mutants  $\Delta 10$  et  $\Delta 15$ , il a été vérifié si la production de composantes virales pouvait être décelée après 24 heures par microscopie à fluorescence en utilisant l'anticorps monoclonal 3C9. Il fut impossible d'obtenir un quelconque signal positif, à l'exception du contrôle sauvage pN2 (données non présentées). Le mutant M0 dont le codon d'initiation de VP2 est éliminé sans être remplacé par un autre montre le même phénotype que les deux autres mutants. Sachant que l'anticorps 3C9 reconnaît la jonction de VP1 et VP2, il est d'une part concevable que les mutations, effectuées dans cette section critique de VP2, nuisent à la reconnaissance de l'épitope. Toutefois, la protéine VP1 ne devrait que subir des changements mineurs et aurait dû, en principe, être tout de même détectée. On peut donc présumer que la seule substitution de la méthionine en alanine dans la séquence de VP1 altère l'épitope reconnu par 3C9. Il est également possible que VP1 soit présente en quantité trop faible pour être détectée.

## 2.2 –Infectivité des mutants

Si des composantes virales sont détectables par immunofluorescence dans les cellules transfectées avec l'ADN des mutants, ce n'est pas le cas lorsqu'on tente d'infecter des cellules PT avec le surnageant de transfection. Ce résultat était anticipé puisque nous avons déjà observé que le virus ne se propageait pas aux cellules avoisinantes même 72 heures après la transfection (données non-présentées).

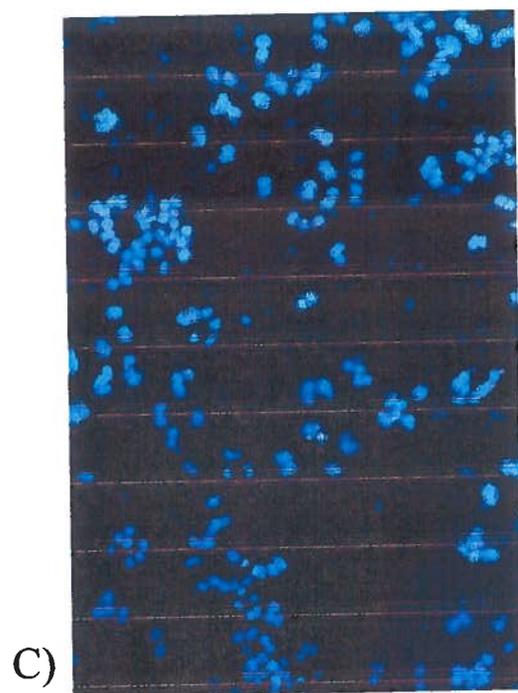
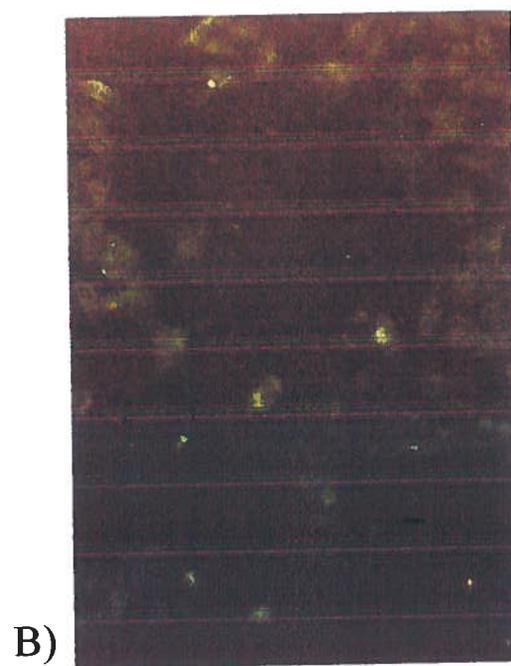
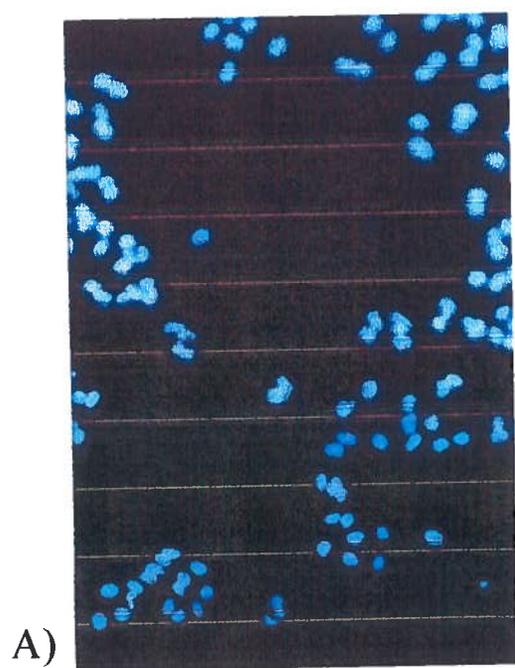
L'isolement de particules virales et détection par immunobuvardage fut tentée suite à la transfection. Toutefois, il semble que l'efficacité de transfection et/ou de la purification des particules soit trop faible pour tirer des conclusions étant donné qu'il est impossible de détecter des protéines de capsides même pour le témoin sauvage de pN2.

**Figure 7 : Observations en microscopie à fluorescence de cellules PT non transfectées et transfectées avec le mutant M0.**

Les cellules ont été fixées 24 heures post-transfection. Une coloration au réactif de Hoescht a été effectuée pour visualiser les noyaux des cellules (A et C). Pour détecter les composantes virales, un anti-sérum de porc infecté au PPV a été utilisé comme anticorps primaire en combinaison avec un anti-IgG de porc couplé au FITC comme anticorps secondaire (B et D).

A et B) Cellules PT contrôles non transfectées. On remarque un bruit de fond important caractérisé par un signal de faible intensité, présent chez toutes les cellules.

C et D) Cellules PT transfectées avec l'ADN du mutant M0. Le signal fluorescent correspond au bruit de fond observé chez le contrôle négatif. Aucune cellule positive n'est observable.

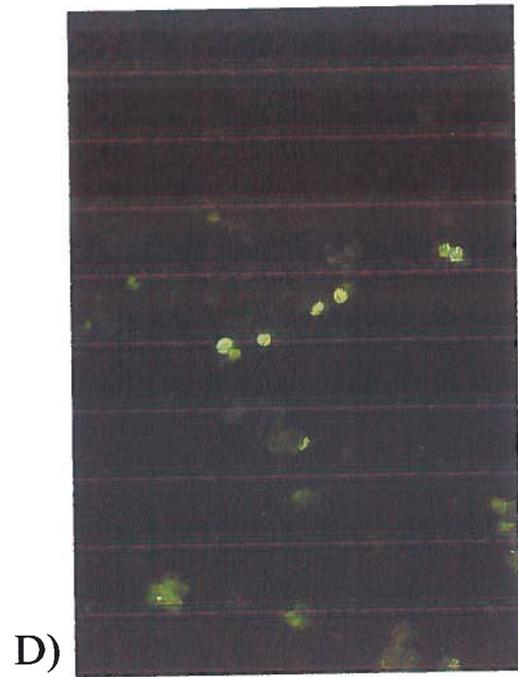
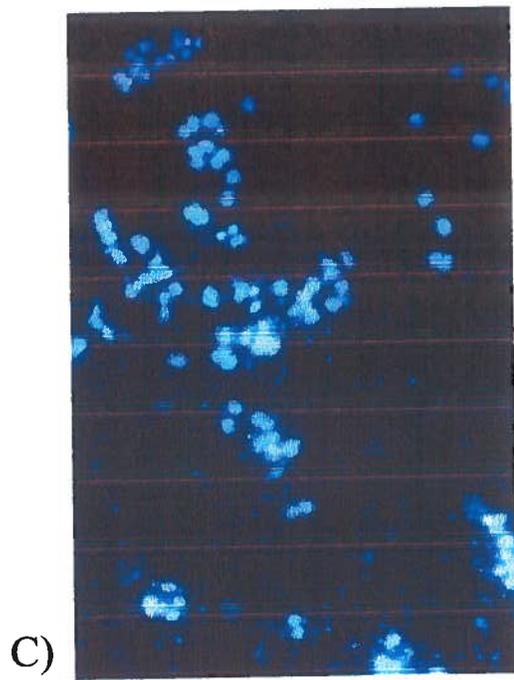
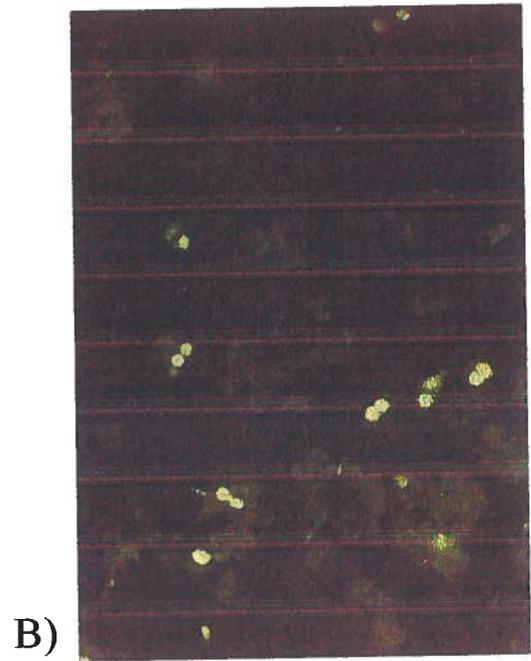
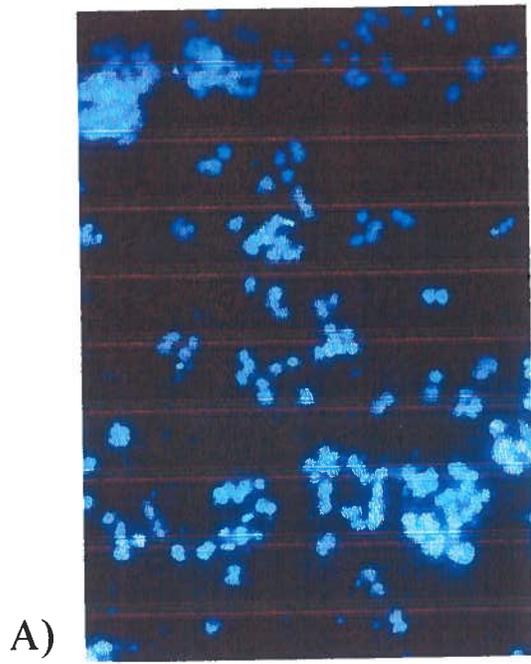


**Figure 8: Observations en microscopie à fluorescence de cellules PT transfectées avec les mutants  $\Delta 10$  et  $\Delta 15$ .**

Les cellules ont été fixées 24 heures post-transfection. Une coloration au réactif de Hoescht a été effectuée pour visualiser les noyaux des cellules (A et C). Pour détecter les composantes virales, un anti-sérum de porc infecté au PPV a été utilisé anticorps primaire en combinaison avec un anti-IgG de porc couplé au FITC comme anticorps secondaire (B et D).

A et B) Cellules PT transfectées avec l'ADN du mutant  $\Delta 10$ . Des cellules positives se distinguent du bruit de fond par une intensité plus forte et une localisation spécifique au noyau.

C et D) Cellules PT transfectées avec l'ADN du mutant  $\Delta 15$ . Des cellules positives sont présentes.



### 3 -Cadres de lecture des différents parvovirus

Les séquences d'acide nucléique et de peptides des plus proches parents du PPV ont été analysées dans le but de vérifier si les caractéristiques relatives au deuxième cadre de lecture et à la protéine alternative étaient conservées chez les *Parvoviridae*.

#### 3.1 -Organisation des cadres de lecture

La première caractéristique contrôlée fut la présence d'un deuxième cadre de lecture ouvert et la disposition, s'il y a lieu, des deux codons de départ. L'étendue des cadres de lecture ouverts alternatifs est inscrite au tableau VII. Tous les parvovirus qui y sont présentés ont un deuxième codon AUG près du début de ce cadre de lecture. On remarque que tous les membres du groupe RV-like ont le même cadre de lecture alternatif décalé de un nucléotide en aval, avec un codon d'initiation commençant à la position +5 par rapport au codon AUG de VP2, numéroté +1 à +3. Le PPV constitue une exception, son codon de départ alternatif étant situé 3 nucléotides plus en aval. La longueur de la séquence codante présente une variation plus importante, la longueur du peptide potentiel se situe entre 53 et 68 acides aminés d'une espèce à l'autre.

Le parvovirus de la maladie aléoutienne de vison, un parent un peu plus éloigné, présente aussi un cadre de lecture ouvert alternatif dans la même région mais aucun codon d'initiation n'est présent. Le BPV, aussi un parent éloigné, possède également un deuxième codon d'initiation mais celui-ci est plus éloigné du premier (+14). De plus, l'étendu du cadre de lecture secondaire est plus courte et ne permettrait que la production d'un peptide de 20 acides aminés. Étant donné ces caractéristiques plus marginales, la possibilité d'existence d'un peptide alternatif chez le BPV est moins évidente que chez les virus présentés au tableau VI. Un cadre de lecture alternatif adéquat n'a pu être trouvé chez le B19 ni chez le AAV.

Les séquences qui entourent ces codons d'initiations ont été comparées à la lumière des connaissances sur le contexte nucléotidique qui favorise l'utilisation d'un codon AUG (Tableau VI). Le PPV ainsi que les membres du groupe CPV/FPV ont un contexte d'initiation très faible autour du premier AUG. Ni la purine en position -3, ni la guanine en position +4 ne sont présentes. Les parvovirus de rongeurs et le LuIII ont un contexte fort pour leur premier AUG, grâce à l'adénine en position -3. Par opposition aux premiers AUG, tous les codons d'initiation des cadres alternatifs sont forts, avec une purine en position -3, et une guanine en position +4 dans huit cas sur dix.

**Tableau VI: Comparaison des cadres de lecture principaux et alternatifs pour différents parvovirus.**

Nucléotide référence : A du AUG de VP2= +1, étendue du cadre = premier nucléotide du premier acide aminé au dernier nucléotide du dernier acide aminé. Position du 2<sup>ème</sup> codon AUG = Position du A

Virus	Étendu du cadre décalé	Contexte du 1 <sup>er</sup> AUG	Position du 2 <sup>ème</sup> codon AUG	Contexte Du 2 <sup>ème</sup> AUG	Longueur du peptide (nombre d'aa)
PPV	+5 à +214	TCAATGA	+11	AAAATGT	68
H1	+5 à +178	ACAATGA	+8	GTGATGG	57
Kilham	+5 à +178	ACTATGA	+8	GTAATGA	57
MVM	+5 à +181	ACCATGA	+8	GTGATGG	58
Souris	+5 à +166	ACAATGA	+8	GTGATGG	53
LuIII	+5 à +166	ACAATGA	+8	GTGATGG	53
Canin	+5 à +211	CCAATGA	+8	GTGATGG	68
Félin	+5 à +211	CCAATGA	+8	GTGATGG	68
Raton	+5 à +211	CCAATGA	+8	GTGATGG	68
Vison	+5 à +211	CCAATGA	+8	GTGATGG	68

### 3.2 -Comparaisons de séquence entre les peptides

La comparaison des séquences en acides aminés du peptide alternatif entre les différents parvovirus nous permet de voir s'il y a une pression évolutive qui favorise la conservation de cette région. Les alignements de séquence du peptide alternatif sont fait en parallèle avec les alignements de séquence de VP2 pour aider à déterminer si la conservation est au niveau de l'une ou l'autre des protéines (Figure 9). On remarque que plusieurs acides aminés de la protéine alternative sont conservés à plus de 90% chez les parvovirus du groupe RV-like. De plus, on remarque que la conservation de ces acides aminés est plus grande pour le cadre de lecture alternatif que pour les acides aminés correspondants dans le cadre de lecture de VP2. Cette dernière observation suggère que la pression évolutive est plus forte sur le cadre de lecture alternatif que sur le cadre de lecture traditionnel,

La comparaison des séquences n'est pas prolongée jusqu'à la fin du peptide alternatif car les taux d'homologie de la séquence riche en glycine sont très élevés pour VP2 et par le fait même pour le peptide alternatif. Toutefois, au delà de la région riche en glycine, d'autres acides aminés de la protéine alternative sont aussi conservés à un haut taux d'homologie.

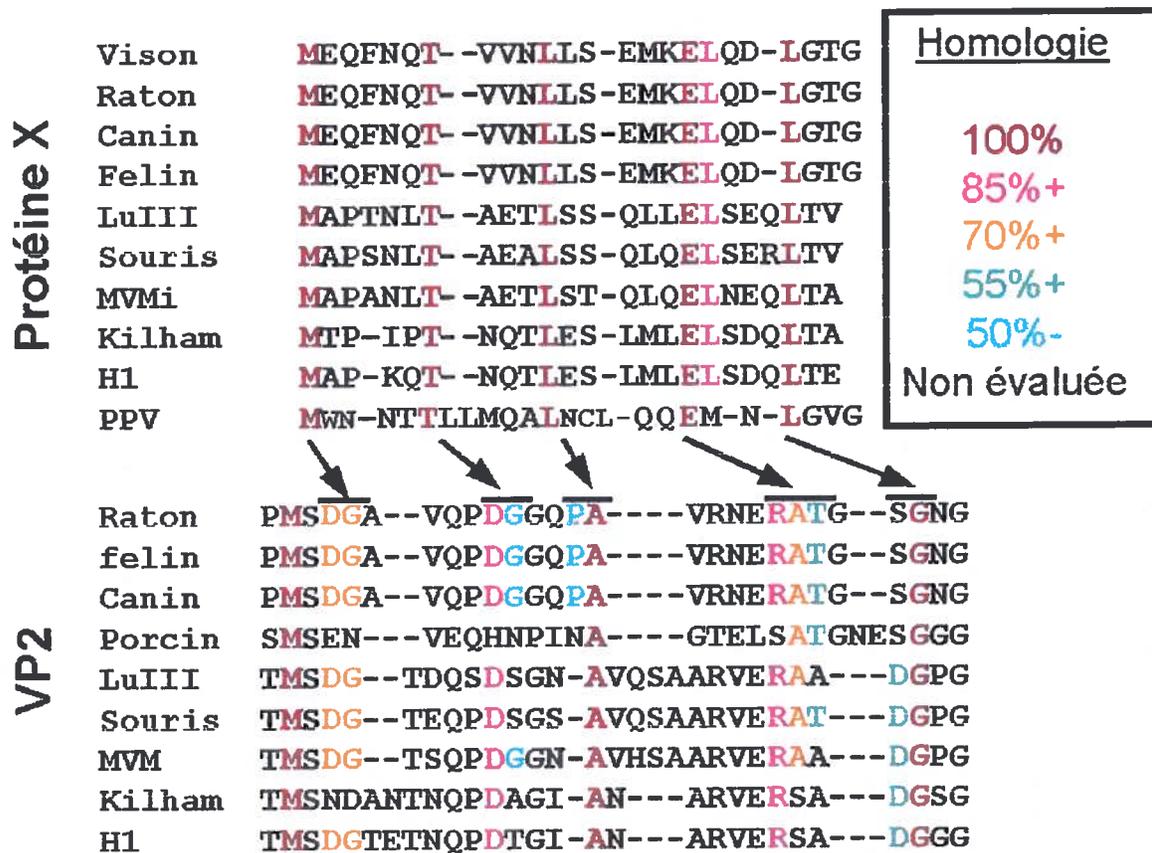


Figure 9 : Alignements de séquences parallèles de la protéine X et de la protéine VP2 entre divers parvovirus.

Seules les portions N-terminales des deux protéines sont présentées. Pour chaque acide aminé, le pourcentage d'homologie entre les espèces comparées ci-dessus est représenté par le code de couleurs indiqué dans la légende. Les flèches relient ensemble les acides aminés des protéines codées par les mêmes nucléotides.

#### 4 -Les mutants M01, MSER et MZ8

Ces trois mutants ont été conçus dans le but de vérifier les effets de mutations qui ont le potentiel de modifier l'efficacité de l'initiation de traduction au codon AUG de VP2 ou d'arrêter prématurément la synthèse de l'éventuelle protéine alternative. Rappelons que les trois bases (TCA) précédant le codon d'initiation de VP2 ont été remplacées par ACA dans le cas de M01 et AGT dans le cas de MSER. Chez ce dernier mutant la sérine est maintenue dans la séquence peptidique de VP1. Ces mutations ont pour but d'optimiser le contexte d'initiation. Le mutant MZ8, quant à lui, contient un codon d'arrêt à l'intérieur du cadre de lecture ouvert codant pour l'éventuelle protéine X.

Comme pour les mutants de délétions, la section de génome entre les sites Kas I et Eco R1 a été séquencée en entier pour les mutants M08, MSER et M01. Le mutant M01, contient une mutation non souhaitée à la position 2800 (A → C) ce qui entraîne un changement d'asparagine pour une lysine sur la portion unique de VP1, quatre acides aminés en amont de la jonction avec VP2. En fait, le mutant MSER fut construit pour corriger cette mutation, tout en remmenant la sérine originale, sans changer le contexte optimal d'initiation. Les résultats de l'analyse du phénotype de M01 sont tout de même présentés car ils se distinguent légèrement de ceux des autres mutants. Les autres mutants ne contiennent aucune mutation indésirable.

La transfection de cellules PT avec l'ADN de ces trois clones infectieux a permis de montrer qu'il est possible de détecter des composantes virales avec l'anticorps monoclonal 3C9. Le tests d'immunofluorescence effectués sur les cellules transfectées ne présente aucune différence avec le clone infectieux original (pN2). En effet, 24 heures après transfection, on note un nombre de cellules positives variant entre 5 et 15%, indépendamment du clone infectieux observé. Cependant après 48 ou 72 heures, on note un plus grand nombre de cellules positives, particulièrement pour le virus sauvage, laissant présager des différences lors de la propagation du virus.

## 4.1 -Caractérisation des stocks de virus

L'utilisation des surnageants de transfection pour infecter d'autres cultures cellulaires a permis de démontrer que les trois mutants sont infectieux. Cinq jours après l'infection, pour des flacons de 75 cm<sup>2</sup>, les nouveaux surnageants contiennent tous des titres viraux relativement semblables entre  $1,3 \times 10^7$  et  $3.35 \times 10^7$ . Bien qu'il y ait une mince différence, on observe que les mutants ne présentent pas une baisse marquée de production à long terme. Des différences surviennent cependant quant au temps d'établissement de l'effet cytopathique, les mutants étant plus lents à cet égard, ce phénomène fut étudié plus en profondeur à la section 4.5.

Il a été vérifié si le nombre d'équivalents génomiques par unité formatrice de foyer fluorescent d'infection (UFF) est équivalent d'un clone infectieux à l'autre. Pour ce faire, la quantification d'ADN viral a été effectuée par PCR quantitatif. Les résultats de la compétition entre le MIMIC et les génomes sont illustrés sur gel d'agarose à la figure 10a. Le nombre de copies génomiques est obtenu par régression logarithmique (figure 10b). Le nombre de génome est en abscisse du point pour lequel le ratio des intensités des bandes de mimic et de génomes est égal à un. Les titres UFF, les équivalents génomiques de même que leurs ratios, indiquant l'infectivité par copie de génome, sont décrits dans le tableau VIII. Ces différences doivent être considérées avec prudence, même si les valeurs semblent indiquer que les stocks n'ont pas exactement les mêmes caractéristiques, il n'est pas non plus possible d'affirmer qu'ils ont des caractéristiques différentes. La variabilité serait plutôt due à la précision de la méthode. D'autres comparaisons du même genre ont été réalisées à deux reprises sur des stocks différents de M01 et pN2 et les résultats avaient aussi un manque de reproductibilité de cet ordre de grandeur sans observer la même tendance quant aux différences entre les stocks.

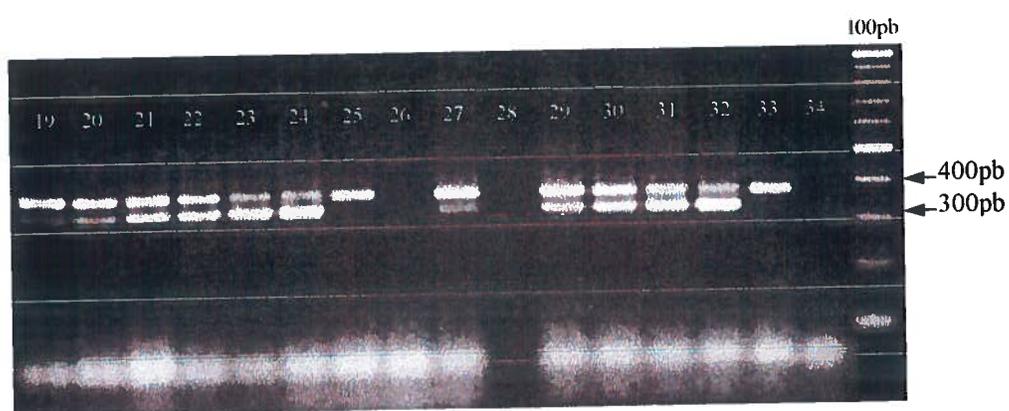
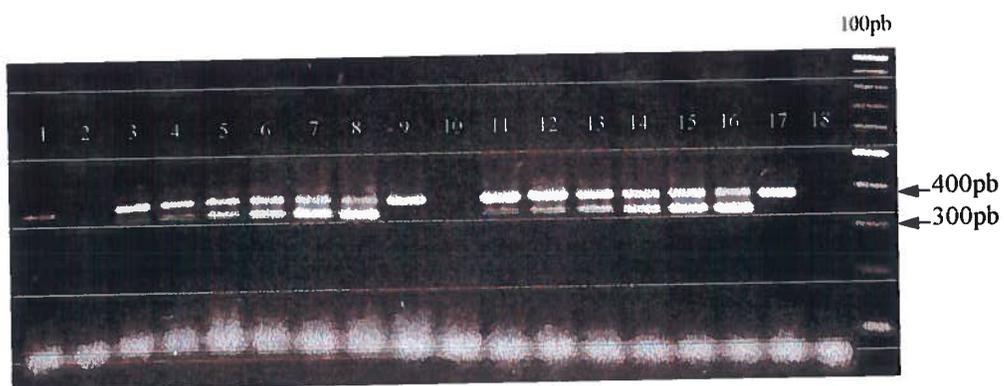
**Figure 10 : Quantification des équivalents génomiques par PCR quantitatif.**

a) Gels illustrant les produits de réaction des PCR compétitifs entre le « mimic » (produit de 331 pb) de concentration connue et l'échantillon viral à quantifier (produit de 372 pb). Le contenu des puits est décrit ci-dessous, l'échantillon viral est toujours dilué 1/100 et ajouté à raison de 1  $\mu$ l), le MIMIC est calculé en attomoles ( $6,023 \times 10^5$  molécules). La réaction 28 est non disponible, la quantification de MZ8 s'est faite selon les autres réactions. Le marqueur de poids moléculaire 100 pb a été utilisé comme référence.

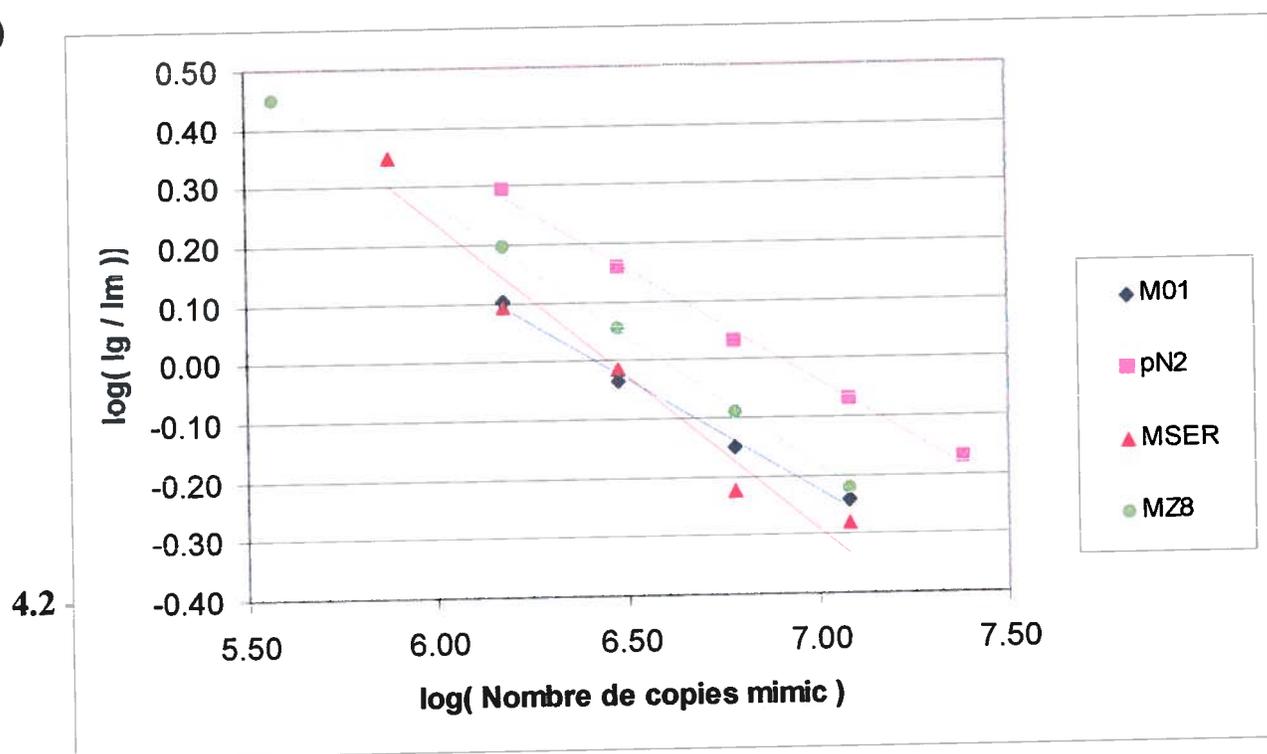
#1	Témoin positif d'amplification du génome
#2, 10, 18, 26, 34	Témoin négatif
#3 à #9	M01 + MIMIC (0.625; 1.25 ; 2.5; 5; 10; 20; 0 attomoles)
#11 à #17	pN2 + MIMIC (1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40; 0 attomoles)
#19 à #25	MSER + MIMIC (0,625; 1.25; 2.5; 5; 10; 20; 0 attomoles)
#27 à #33	MZ8 + MIMIC (0,625; xxx; 2,5; 5; 10; 20; 0 attomoles)

b) Graphique représentant les courbes du logarithme du rapport d'intensité des produits d'amplification du génome et du MIMIC ( $I_g/I_m$ ) en fonction du logarithme du nombre de copies de mimic présentes. Lorsque  $\log(I_g/I_m) = 0$ , la quantité d'équivalents génomiques est égale à la quantité de molécules de mimic.

A)



B)



**Tableau VII: Caractérisation des stocks de mutants et virus sauvage.**

Le rapport de copies génomique par unité formatrice de foyer fluorescent (FFU) à été déterminé par titrage en immunofluorescence et PCR quantitatif.

Clone	FFU par ml	Copies génomiques par ml	Ratio Copies génomiques/FFU
pN2	$6.3 \times 10^6$	$7.1 \times 10^{11}$	$1.1 \times 10^5$
M1	$8.1 \times 10^6$	$2.3 \times 10^{11}$	$2.8 \times 10^4$
MSER	$1.6 \times 10^6$	$2.5 \times 10^{11}$	$1.6 \times 10^5$
MZ8	$4.1 \times 10^6$	$3.5 \times 10^{11}$	$8.5 \times 10^4$

délétion, nous a permis d'établir une cinétique d'infection en parallèle avec le virus sauvage. Cette cinétique a généré deux types de résultats: d'abord, le suivi de l'infection en observant directement les cellules infectées sur les plaques par immunofluorescence indirecte aux différents points d'échantillonnage; ensuite le titre viral des surnageant recueillis à chacun de ces points d'échantillonnage qui sera présenté à la prochaine section.

Pour la cinétique, chacun des clones a été utilisé à deux MOI différentes, de  $2,5 \times 10^{-3}$  et  $2,5 \times 10^{-2}$ . Chaque infection a été effectuée en duplicata. Les données recueillies directement sur les plaques infectées par immunofluorescence indirecte utilisant l'anticorps 3C9 sont présentées dans les tableaux VIII (MOI =  $2,5 \times 10^{-3}$ ) et IX (MOI =  $2,5 \times 10^{-2}$ ). Malgré leur nature semi-quantitative, ces résultats reflètent bien la progression de l'infection pour chacun des clones infectieux et permettent de discerner des différences phénotypiques entre les mutants et la souche sauvage.

Les résultats obtenus au premier point d'échantillonnage (16 heures) nous permettaient d'établir que le même nombre de cellules sont infectés pour chaque clone

infectieux au début de la cinétique. Les virus mutants semblent ensuite se propager à la même vitesse jusqu'au quatrième point d'échantillonnage (28 heures). À partir de 32 heures, on commence à apercevoir des foyers d'infections où plusieurs cellules adjacentes sont positives mais uniquement dans le cas du type sauvage pN2. On observe de tels foyers seulement après 44 heures dans le cas des mutants, soit 12 heures plus tard. Toujours à 32 heures, entre 2 et 20% des cellules sont déjà infectées dans le cas de la souche sauvage pN2 à MOI de  $2,5 \times 10^{-2}$ , alors que les mutants sont aux environs de 400 cellules positives et moins ( $< 1\%$ ). Il est à noter que l'amas de cellules infectées observé après 28 heures pour MZ8 (MOI =  $2,5 \times 10^{-3}$ ) n'est pas considéré comme le résultat d'une deuxième génération virale (voir discussion). À 44 heures, pour la MOI de  $2,5 \times 10^{-2}$ , le virus pN2 à déjà infecté plus de 60% des cellules, alors que les mutants sont toujours à moins de 40%. Les figures 11, 12 et 13 permettent de suivre l'évolution de l'infection pour les quatre clones infectieux aux temps 20, 30 et 40 heures respectivement. L'ensemble de ces résultats indique une progression significativement plus rapide du virus sauvage par rapport aux mutants. Une autre différence observable entre les souches mutées et le virus original est que ce dernier cause un effet cytopathique après 54 heures contrairement à tous les autres qui n'ont pas causés d'effet cytopathique à l'intérieur des temps d'observations. Des résultats plus détaillés sur le sujet seront présentés à la section 4.5.

Les données recueillies directement sur les plaques ne permettent pas de déceler clairement des différences entre les trois mutants eux-mêmes. Toutefois, selon les résultats de 48 et 54 heures, on remarque un léger avantage pour MSER tandis que le mutant M01 semble être celui qui se propage le plus lentement.

### **4.3 -La cinétique d'infection en titrage**

L'autre aspect observé pour caractériser la cinétique est la quantité d'UFF présentes dans les surnageants infectieux aux différents points de contrôle. Ce paramètre fut déterminé par titrage et les données sont présentées au tableau X et à la figure 14. Les surnageants titrés sont ceux de la MOI de  $2,5 \times 10^{-2}$ , soit la plus élevée. Pour tous les virus, chaque

duplicata de la cinétique fut titré en triplicata. Les valeurs présentées ont été obtenues par la moyenne des six titrages pour chaque mutant, à chacun des points d'échantillonnage.

Les premiers résultats de titrage sont pour le point d'échantillonnage de 20 heures car la quantité de virus présents dans les échantillons de 16 heures était trop basse pour être évaluée. Cependant, on peut utiliser les valeurs recueillies après 20 heures directement sur les plaques de cinétiques pour évaluer la quantité de FFU présentes au temps zéro puisque c'est exactement de cette façon que les titrages sont effectués. De cette façon on constate que la quantité d'UFF ayant initié chaque infection était semblable pour tous les mutants et la souche sauvage. Déjà après 20 heures, on observe environ trois fois plus de virus en suspension pour pN2 que pour les mutants. Il est à noter qu'au même moment, l'immunofluorescence directement sur les plaques ne montrait pas une telle différence ce qui signifie que la différence se situe au niveau des virus nouvellement synthétisés. On note que le titre de pN2 augmente d'un facteur de 10 entre 36 et 44 heures et atteint plus de  $5 \times 10^4$  UFF/ml alors que les mutants sont plutôt stables à moins de  $3 \times 10^3$  UFF/ml. Toutefois il semble que cette augmentation rapide ne soit que retardée ; entre 54 et 60 heures, MSER augmente son titre d'un facteur de 18, MZ8 d'un facteur de 9 et M01 d'un facteur de 4. La comparaison des trois mutants entre eux pour le titrage du dernier point d'échantillonnage (72 heures) indique plus clairement ce que laissait entrevoir l'immunofluorescence sur les plaques: MSER se reproduit plus rapidement que MZ8 et M01 semble être le plus lent des trois.

Certains des résultats semblent aberrants à première vue. On remarque qu'entre 24 et 28 heures le titre baisse pour tous les mutants alors que pN2 montre une augmentation relativement faible. Il est difficile d'expliquer la cause de cette baisse du titre. Encore plus surprenant est le même type de diminution entre 60 et 66 heures au moment où tous les virus semblaient pourtant en forte répllication. Ces résultats inattendus seront discutés dans le prochain chapitre, ils ne compromettent toutefois pas la mise en évidence de différences importantes quant à la vitesse de croissance des mutants infectieux et de la souche sauvage.

**Tableau VIII: Observations au cours de la cinétique d'infection pour les mutants M01, MSER et MZ8 en parallèle avec la souche sauvage (MOI de  $2,5 \times 10^{-3}$ ).**

La première ligne de chaque case indique une approximation du nombre brut ou d'une évaluation du nombre de cellules infectées. La deuxième ligne indique, s'il y a lieu, le nombre (plusieurs si aucun nombre n'est spécifié) de plaques (p) ou d'amas de cellules infectées (\*) avec l'approximation du nombre de cellules dont ils sont formés entre parenthèse.

Légende : NA = Non applicable parce qu'infection généralisée

EC = Effet cytopathique  
ND = Donnée non disponible

+ = Entre 2 et 20%  
++ = Entre 21 et 40%  
+++ = Entre 41 et 60%  
++++ = Entre 61 et 80%  
+++++ = Entre 81 et 100%

Point d'échantillonnage (heures)	pN2		M01		MSER		MZ8	
16	9	6	6	20	6	10	12	11
20	8	13	84	89	93	88	128	147
24	42	48	26	24	38	33	27	36
28	39	56	36	40	34	41	47 1 * (10)	39
32	54 2 * (6)	58 4 * (6)	46	42	51	54	45	44
36	-200 7 p (25)	-200 7 p (20)	36	37	38	33	45	53
44	+ 7 p (40)	+ 8 p (50)	-100 3 * (8)	-100 1*(5)+ 1p(30)	-150 1p(10)+ 1p(30)	-125 1 p(10)	-150 1 p(100)	ND
48	+++ (NA)	+++ (NA)	+ 1 p (100)	+ 1p(100)+ 3p(20)	+ 2 p (50)+ 2 p (20)	+ 5 p (50)	+ 1 p (50)+ 1 p 10	+ 2 p (30)
60	+++++ (EC)	+++++ (EC)	++ 8 p (150)	++ 7 p (150)	+++ (NA)	+++ (NA)	+++ (NA)	+++ (NA)

**Tableau IX : Observations au cours de la cinétique d'infection pour les mutants M01, MSER et MZ8 en parallèle avec la souche sauvage (MOI de  $2,5 \times 10^{-2}$ ).**

La première ligne de chaque case indique une approximation du nombre brut ou d'une évaluation du nombre de cellules infectées. La deuxième ligne indique, s'il y a lieu, le nombre (plusieurs si aucun nombre n'est spécifié) de plaques (p) ou d'amas de cellules infectées (\*) avec l'approximation du nombre de cellules dont ils sont formés entre parenthèse.

Légende :

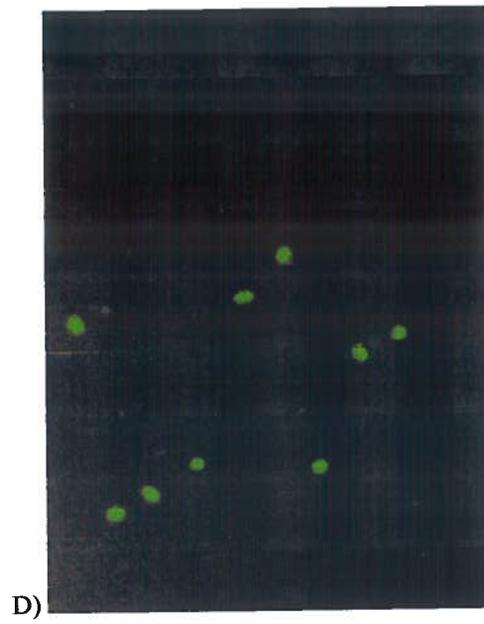
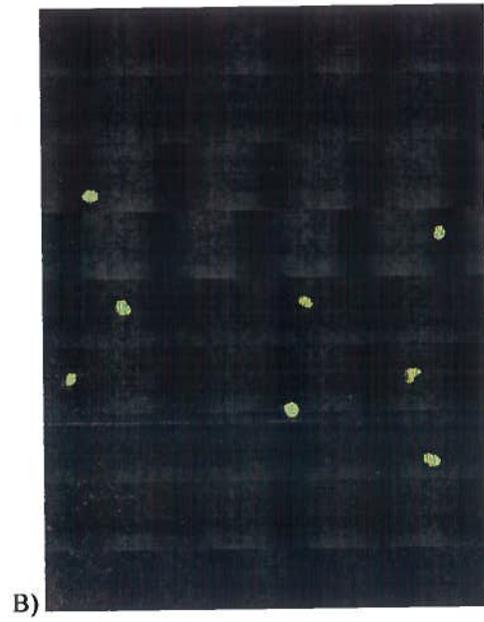
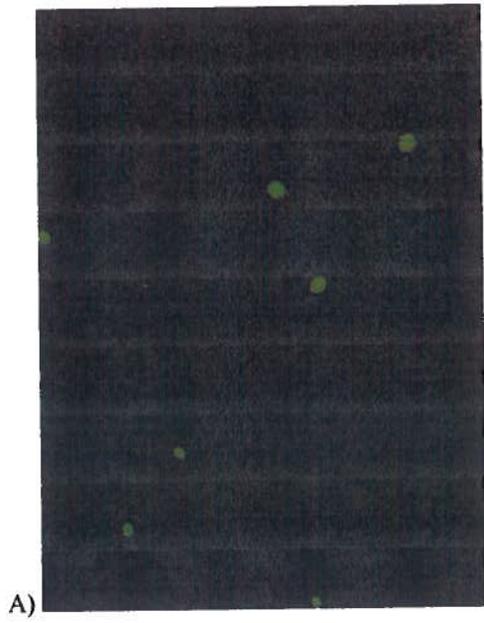
NA	= Non applicable parce qu'infection généralisée
EC	= Effet cytopathique
ND	= Donnée non disponible
+	= Entre 2 et 20%
++	= Entre 21 et 40%
+++	= Entre 41 et 60%
++++	= Entre 61 et 80%
+++++	= Entre 81 et 100%



**Figure 11 :. Immunofluorescence des clones infectieux pN2, M01, MSER et MZ8 20 heures post-infection.**

Photo prise sur une culture de cellules PT sur plaque de 24 puits infectée à MOI de  $10^{-3}$  20 heures après infection. Révélé avec anticorps 3C9 et anti-souris conjugués à la fluorescéine.

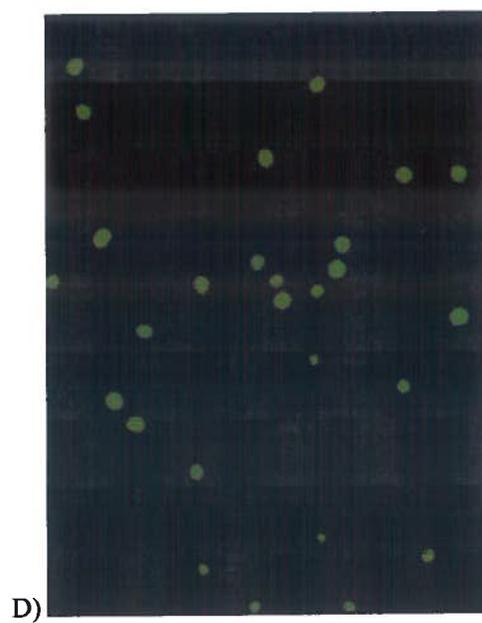
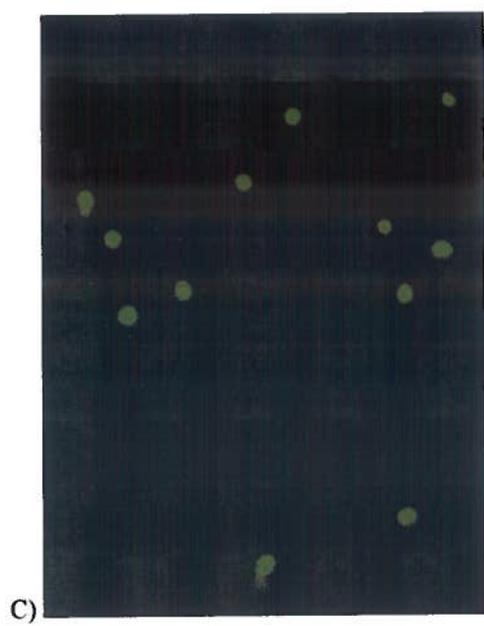
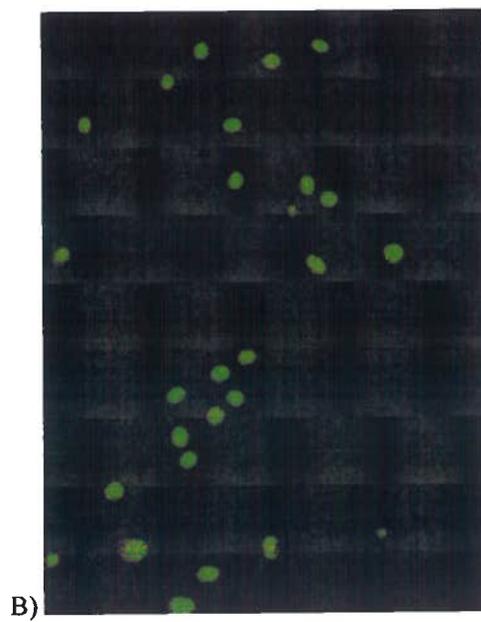
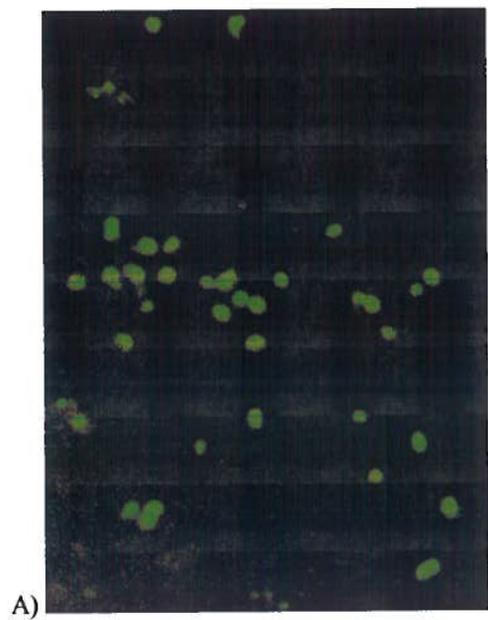
- A) Clone infectieux sauvage pN2
- B) Clone infectieux mutant M1
- C) Clone infectieux mutant MSER
- D) Clone infectieux mutant MZ8



**Figure 12 : Immunofluorescence des clones infectieux pN2, M01, MSER et MZ8 30 heures post-infection.**

Photo prise sur une culture de cellules PT sur plaque de 24 puits infectée à MOI de  $10^{-3}$  30 heures après infection. Révélé avec anticorps 3C9 et anti-souris conjugués à la fluorescéine.

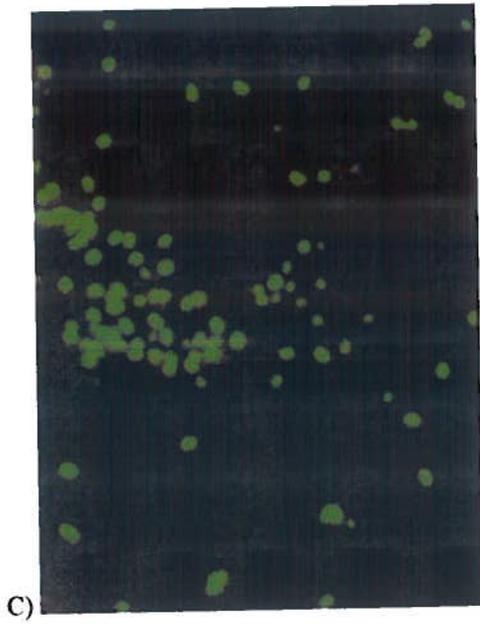
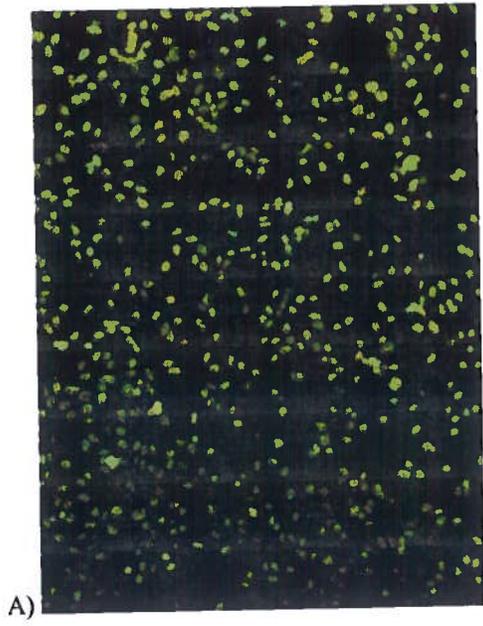
- A) Clone infectieux sauvage pN2
- B) Clone infectieux mutant M1
- C) Clone infectieux mutant MSER
- D) Clone infectieux mutant MZ8



**Figure 13 : Immunofluorescence des clones infectieux pN2, M01, MSER et MZ8  
40 heures post-infection.**

Photo prise sur une culture de cellules PT sur plaque de 24 puits infectée à MOI de  $10^{-3}$  30 heures après infection. Révélé avec anticorps 3C9 et anti-souris conjugués à la fluorescéine.

- A) Clone infectieux sauvage pN2
- B) Clone infectieux mutant M1
- C) Clone infectieux mutant MSER
- D) Clone infectieux mutant MZ8



**Tableau X : Titrage des surnageants recueillis lors de la cinétique d'infection.**

Les mutants M01, MSER et MZ8 sont comparés à la souche sauvage pN2 pour chaque point de contrôle de la cinétique. Il s'agit de la valeur moyenne obtenue avec six titrages (chaque duplicata de la cinétique fut titré en triplicata). La marge d'erreur est aussi indiquée pour chaque titre.

Point d'échantillonnage	pN2		M01		MSER		MZ8	
	Titre (UFF/ml)		Titre (UFF/ml)		Titre (UFF/ml)		Titre (UFF/ml)	
20	(1,54±0,11) x 10 <sup>3</sup>	(4,42±0,60) x 10 <sup>2</sup>	(5,00±0,64) x 10 <sup>2</sup>	(6,50±0,73) x 10 <sup>2</sup>				
24	(2,58±0,14) x 10 <sup>3</sup>	(6,25±0,72) x 10 <sup>2</sup>	(1,20±0,10) x 10 <sup>3</sup>	(1,29±0,10) x 10 <sup>3</sup>				
28	(2,73±0,15) x 10 <sup>3</sup>	(3,58±0,60) x 10 <sup>2</sup>	(5,67±0,69) x 10 <sup>2</sup>	(6,00±0,77) x 10 <sup>2</sup>				
32	(3,08±0,16) x 10 <sup>3</sup>	(5,33±0,67) x 10 <sup>2</sup>	(1,30±0,13) x 10 <sup>3</sup>	(8,17±0,82) x 10 <sup>2</sup>				
36	(3,24±0,16) x 10 <sup>3</sup>	(8,42±0,84) x 10 <sup>2</sup>	(1,31±0,10) x 10 <sup>3</sup>	(7,75±0,80) x 10 <sup>2</sup>				
44	(5,24±0,21) x 10 <sup>4</sup>	(7,00±0,76) x 10 <sup>2</sup>	(1,39±0,11) x 10 <sup>3</sup>	(2,82±0,15) x 10 <sup>3</sup>				
48	(1,53±0,11) x 10 <sup>5</sup>	(3,67±0,18) x 10 <sup>3</sup>	(6,89±0,24) x 10 <sup>3</sup>	(3,18±0,16) x 10 <sup>3</sup>				
54	(2,83±0,15) x 10 <sup>5</sup>	(1,49±0,11) x 10 <sup>4</sup>	(1,45±0,11) x 10 <sup>4</sup>	(8,00±0,82) x 10 <sup>3</sup>				
60	(9,73±0,29) x 10 <sup>5</sup>	(6,61±0,24) x 10 <sup>4</sup>	(2,62±0,15) x 10 <sup>5</sup>	(7,25±0,78) x 10 <sup>4</sup>				
66	(4,73±0,20) x 10 <sup>5</sup>	(7,08±0,77) x 10 <sup>4</sup>	(1,58±0,12) x 10 <sup>5</sup>	(8,04±0,90) x 10 <sup>4</sup>				
72	(2,22±0,15) x 10 <sup>6</sup>	(2,04±0,14) x 10 <sup>5</sup>	(1,29±0,11) x 10 <sup>6</sup>	(3,85±0,20) x 10 <sup>5</sup>				

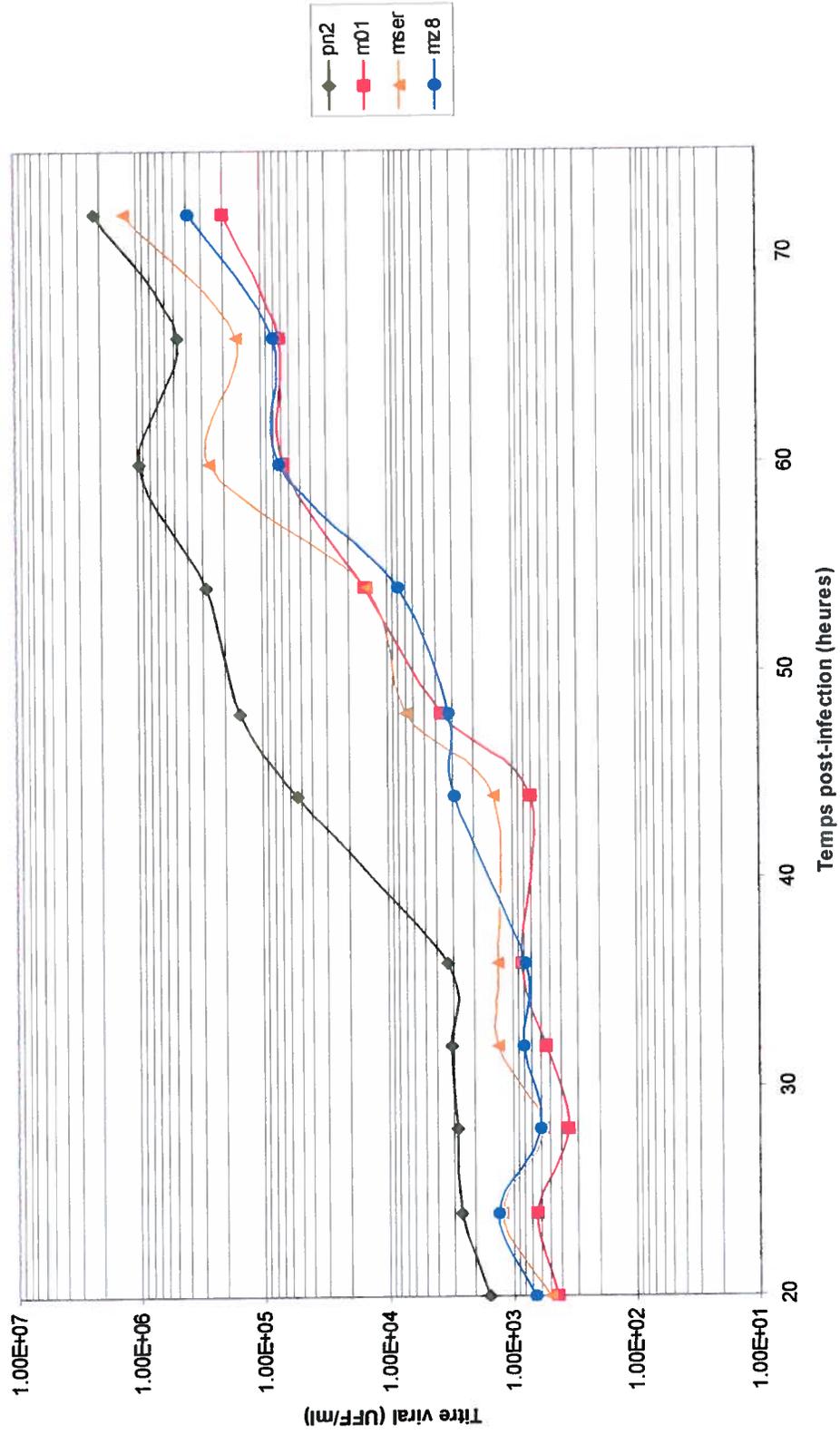


Figure 14 : Courbe de répllication virale de pN2 et des mutants M01, MSER et MZ8.

#### 4.4 -Infections combinées

Dans l'optique où les différences observées lors de la cinétique étaient dues à la protéine X virale, il était intéressant de vérifier si la protéine X était sécrétée dans le milieu lors de l'infection de la cellule hôte et agissait ainsi sur la sensibilité des cellules avoisinantes face à l'infection virale. Cette possibilité a été explorée en effectuant une infection à faible MOI de  $3,75 \times 10^{-3}$ , suivie d'une deuxième infection 20 heures plus tard à une MOI de 1. Toutes les combinaisons possibles ont été testées ainsi avec les contrôles non-infectés appropriés. Selon les résultats obtenus, il n'est pas possible de détecter une différence significative. Toutes les combinaisons donnent plus de 80% de cellules positives après 40 heures d'infection au total.

#### 4.5 -Effet cytopathique

Les effets cytopathiques occasionnés par l'infection à haute MOI de chacun des mutants et de pN2 ont été suivis pendant trois jours. L'ensemble des résultats est présenté au tableau XI. On remarque que déjà après 24 heures il y a considérablement plus de cellules mortes pour le virus sauvage. Comme pour les cinétiques d'infection, les phénotypes des mutants M1 et MZ8 sont plus affectés que celui de MSER. On s'aperçoit que même après 72 heures, il y a toujours une bonne proportion de cellules vivantes, au moins 40%, pour tous les mutants et particulièrement MZ8. Cependant, il ne faut pas cependant négliger le fait qu'une partie des cellules aient décollées du fond des puits et que celles-ci sont également mortes. Les pourcentages indiqués concernent donc uniquement les cellules restantes. Cependant, même si ce paramètre fait augmenter le pourcentage réel de cellules mortes, il accentue aussi les différences observées entre les virus mutants et pN2.

**Tableau XI : Comparaison de l'effet cytopathique causé par le virus sauvage et les virus mutants a différents temps post-infection à haute MOI.**

Le pourcentage de cellules mortes fut estimé après coloration au bleu de trypan. Pour les cellules restantes, chaque (+) représente une tranche d'environ 20% des cellules initiales.

Temps (h)	pN2		M01		MSER		MZ8	
	Cellules Restantes	Mortalité (%)						
24	+++++	25	+++++	5	+++++	10	+++++	8
27	++++	45	+++++	10	+++++	25	+++++	10
30	+++	65	+++++	15	+++++	50	+++++	15
48	++	90	++++	50	+++	65	++++	50
72	+	90	+++	60	+++	60	+++	40

## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION**

## 1 –Portion unique et maturation de VP2

Le but premier de ce projet était d'identifier le site de maturation protéolytique naturelle de la protéine VP2 en VP3 chez le parvovirus porcine. À partir de cette information, des mutants avec la portion N-terminale de VP2 progressivement délétée ont été construits afin de déterminer le rôle de cette partie de la capsid dans le cycle viral et la raison de son clivage, une caractéristique conservée chez tous les membres du genre *Parvovirus*.

### 1.1 –Séquençage de l'extrémité N-terminal de VP3

Bien que la production et la purification des capsides de PPV ait été suffisante pour pouvoir séquencer les protéines virales, cette étape préliminaire n'a pas été aussi efficace que prévue. Le virus avait une forte tendance à former des agrégats, problème qui a été partiellement réglé en travaillant dans des solutions à pH plus élevé et faible salinité. Toutefois cette agglomération a sans doute diminué la récolte virale, une certaine portion du virus restant enchevêtrée dans les débris cellulaires. De plus, la séparation du virus dans un gradient continu de chlorure de césium était aberrante empêchant la séparation des particules vides et des deux types de particules pleines (lourdes et légères). Nous avons donc été contraints à procéder à la séparation des composantes virales à partir de particules n'ayant été purifiées que par un simple coussin de saccharose.

Lors de la séparation des protéines virales sur gel de polyacrylamide, les trois bandes observées nous ont amené à croire qu'il s'agissait du patron classique de migration VP1, VP2 et VP3, bien que les poids moléculaires semblaient légèrement trop élevés. Ce détail ne semblait pas un problème puisque le témoin de BSA avait lui aussi une migration plus lente que prévue. Toutefois, le résultat de séquençage de la troisième bande (70,0 kDa) a donné la séquence de la BSA. Il nous a été impossible de déterminer si la bande observée est effectivement une contamination de BSA ou s'il s'agit d'une protéine virale dont l'extrémité N-terminale est bloquée, donnant donc l'avantage lors du

séquençage à une faible contamination autrement invisible sur le gel. L'utilisation d'un sérum anti-PPV en immunobuvardage ne nous a pas permis d'éclaircir cette question en raison d'une forte réaction croisée avec la BSA. Le seul anticorps monoclonal disponible pour le PPV, 3C9, est incapable de détecter VP3. Cette contamination provient probablement du sérum bovin utilisé pour la culture des cellules PT. Il aurait été intéressant de tenter une production de PPV sur des cellules poussant sans sérum bovin, cependant, de telles lignées cellulaires permettant la production de PPV ne sont pas connues.

La possibilité que la bande majeure (74,4 kDa) soit VP3 a été considérée. En fait, il est connu que VP3 devient la protéine majeure après maturation de VP2 tel qu'observé dans les bandes de particules pleines légères (Tattersall *et al.*, 1976 ; Clinton, Hayashi, 1975). Toutefois, en principe, notre technique de purification ne permet pas de se débarrasser des particules vides qui contiennent uniquement VP2 comme protéine majeure. Ces particules vides peuvent constituer près de la moitié de la récolte *in vivo* (Molitor, Joo, 1983), ce qui résulterait en une quantité importante de VP2 dans l'échantillon de virus purifié.

Devant l'impossibilité de résoudre avec certitude le patron de migration des protéines virales, nous avons effectué une deuxième tentative de séquençage sur cette bande majeure. Les signaux obtenus sont constitués en grande partie de bruit de fond ce qui nuit en quelque sorte à l'analyse. Toutefois plusieurs informations intéressantes en ressortent. D'abord la séquence de BSA obtenue précédemment est introuvable. De plus la séquence de la portion N-terminale de VP2 est également absente, suggérant que si VP2 est présente dans la bande majeure, soit son extrémité est bloquée, soit elle s'y retrouve en proportion minime. Le plus intéressant est de pouvoir reconstituer intégralement deux séquences qui pourrait être la portion N-terminale de VP3. D'abord la séquence ELSATG qui génère un signal particulièrement fort. La deuxième séquence, TELSAT, se trouve à être la même que la précédente, uniquement décalée de un résidu

vers l'extrémité N-terminale. Ces deux séquences commencent aux acides aminés 15 et 16 de VP2 respectivement.

Bien que le bruit de fond important puisse semer le doute sur la pertinence d'associer ces séquences à l'extrémité N-terminale de VP3, plusieurs éléments importants nous poussent vers cette conclusion. La possibilité statistique de retrouver intégralement une séquence donnée à partir de ces signaux est de 1/1128, or, deux séquences consécutives de VP2 ont pu être reconstituées et aucune autre séquence de VP2 n'a pu être identifiée. La position des deux séquences correspond bien avec le modèle selon lequel VP2 est clivé juste en N-terminal de la séquence riche en glycine, ce qui permet son exposition à la surface de la capsid en passant à travers le pore de l'axe 5 (Tsao *et al.*, 1991 ; Abgandje-McKenna *et al.*, 1998). De plus, l'extrémité de VP3 a été déterminée chez le CPV (Weichert *et al.*, 1998), le premier acide aminé étant le 20<sup>ième</sup> de VP2. Même si on ne peut faire de rapprochement entre les séquences et la position obtenus chez le CPV et nos résultats, la différence est petite compte tenu que le CPV et le PPV sont considérablement différents dans cette région (voir figure 9). Finalement, chez le MVM (Tullis, Burger, Pintel, 1992), une tentative de séquençage a aussi révélé des séquences hétérogènes juste en amont de la série de glycinés. Ces observations, ainsi que les nôtres suggèrent que le clivage pourrait se faire à un site non-spécifique de séquence. Il a été rapporté que certaines tentatives de séquençage directe de la VP3 ont échouées en raison de blocage de l'extrémité N-terminale (Cotmore, Tattersall, 1987). Il semblerait donc que le succès de telles tentatives puissent dépendre de l'espèce de parvovirus ou de certaines particularités de la technique utilisée. Il reste également possible que les extrémités N-terminales de VP3 déterminées ici soient minoritaires et que d'autres extrémités soient bloquées. Toutefois, une protéine digérée par une protéase ne devrait normalement pas être bloquée, ce phénomène est plutôt associé à une méthionine.

## 1.2 -Mutants de délétions

Les résultats de séquençage de VP3 obtenus ont été utilisés pour créer un mutant avec une VP2 tronquée de 15 acides aminés ( $\Delta 15$ ) imitant VP3. Un autre mutant avec une VP2 délétée de 10 acides aminés ( $\Delta 10$ ) a aussi été créé. Le codon de départ de VP2 a été déplacé en aval pour créer ces mutants. Il demeure très important de considérer lors de l'analyse des nouveaux phénotypes que les mutations effectuées dans VP2 se répercutent aussi sur VP1.

L'anticorps 3C9, utilisé normalement pour l'immunofluorescence indirecte sur les cellules infectées par le PPV, s'est révélé inefficace pour les cellules infectées par les deux mutants ainsi que pour le mutant M0 qui ne possède pas de codon d'initiation de VP2. Le fait que le 3C9 reconnaisse un épitope chevauchant la région N-terminale de VP2 (Gariépy, 2000), éliminée dans tous les cas décrits ici, explique en partie le phénomène. Toutefois, il est surprenant que VP1, qui contient néanmoins cette région et ne devrait subir que des différences mineures, ne soit pas reconnue par le 3C9. On peut supposer entre autres que la méthionine N-terminale de VP2, changée ici pour une alanine, est importante pour la liaison de l'anticorps. Cependant, le fait que le sérum polyclonal contre le PPV ne réussissent pas à détecter de produits viraux chez le mutant M0 laisse croire que la protéine VP1 pourrait être particulièrement difficile à détecter. Comme explication, on peut penser qu'elle est instable ou incorrectement repliée en absence de VP2, où alors que la formation de capsides ou de protomères est importante pour l'exposition de l'épitope de 3C9 ou pour la stabilité des protéines structurales. Quoiqu'il en soit, le fait que VP1 à elle seule ne soit pas suffisante pour donner un signal d'immunofluorescence positif nous permet de confirmer que les protéines tronquées sont exprimées lors de la transfection étant donné que l'anticorps polyclonal détecte les cellules transfectées avec les mutants  $\Delta 15$  et  $\Delta 10$ .

Cependant, les clones infectieux mutants sont défectifs pour leur propagation, que ce soit lors de la transfection même ou après avoir transféré le surnageant à une nouvelle

culture cellulaire. Les raisons qui expliquent la perte d'infectivité sont inconnues. Il a été impossible de déterminer, par microscopie électronique, si des capsides étaient formées, même en utilisant le clone sauvage pN2. L'efficacité de la transfection et de la purification ne permet pas de détecter des particules sans qu'il y ait amplification par réplication intensive. Il en est de même pour les tests d'immunobuvardage.

Une possibilité est que lors du déplacement du codon de départ de VP2, nous avons favorisé l'utilisation du codon de départ du cadre de lecture alternatif. Toutefois, tel que mentionné plus haut, la synthèse des protéines VP2 tronquées a été confirmée pour les deux mutants. La préférence pour le codon AUG du cadre alternatif cause donc probablement, au plus, une diminution de l'expression de VP2. La possibilité que cette baisse d'expression soit la cause de la perte totale d'infectivité est questionnable mais pourrait être vérifiée par la création de nouveaux mutants sans codon d'initiation du cadre alternatif.

## **2 -Cadre de lecture alternatif et protéine X**

L'autre volet de ce projet consistait d'une part à caractériser l'organisation du cadre de lecture alternative en identifiant les éléments essentiels et en comparant celui du PPV avec ces plus proches parents. Nous avons cependant dû limiter la caractérisation du produit à une approche indirecte de mutagenèse, les tentatives de produire la protéine X dans un système procaryote étant restées sans succès.

### **2.1 –Caractérisation du cadre de lecture alternatif et de la protéine X**

Le cadre de lecture alternatif du parvovirus n'est pas présent chez le AAV et le B19, des parvovirus des autres genres, ce qui laisse sous-entendre qu'il ne s'agirait pas d'un produit essentiel à la propagation du virus. Toutefois, la présence de ce cadre de lecture et l'ensemble des caractéristiques qui permettent son utilisation malgré un codon

AUG en aval sont remarquablement bien conservées. Ceci nous permet de croire qu'une fonction donnant un certain avantage au virus est codé par ce cadre de lecture.

On remarque par contre que les parvovirus de rongeurs ont un contexte d'initiation passablement fort (A en position -3) selon la séquence de Kozak (1987). Cependant, il est connu que même des codons AUG entourés d'un contexte fort peuvent être ignorés à la faveur d'un deuxième codon de départ situé très près en aval (Kozak, 1995). Dans cette optique il est à noter que le PPV est le seul de ces virus dont les deux codons AUG soient séparés de 7 nucléotides. Pour tous les autres virus, les deux codons d'initiations sont séparés de 4 nucléotides seulement. Il est possible que le contexte d'initiation de VP2 du PPV soit plus faible (T en position -3) pour combler cette plus grande distance. Les effets de la mutation de la thymine pour une adénine en position -3 sont discutée à la section 2.2. Par opposition au premier codon d'initiation, tous les codons AUG alternatifs sont dans un contexte fort (A ou G en position -3), optimisant ainsi leur utilisation.

La longueur des protéines théoriquement synthétisées selon le cadre de lecture alternatif est relativement constante d'un parvovirus à l'autre ce qui contribue également à donner du poids à l'hypothèse que la protéine X soit produite et ait un rôle à jouer chez ces virus.

## **2.2 –Phénotype des mutants**

Bien que le mutant M01 contienne une mutation indésirable dans la région unique de VP1, il n'a pas été reconstruit. La raison est que, par après, le mutant MSER a été conçu dans la même optique, c'est-à-dire de vérifier quel serait le phénotype d'un mutant de PPV dont le contexte d'initiation au codon de départ de VP2 est fort. MSER avait de plus l'avantage de ne causer aucun changement d'acide aminé dans la séquence de VP1. Toutefois, le mutant M01 fut quand même étudié et les résultats ont été présentés car son phénotype est distinct de MSER.

Les mutations introduites dans MSER, MZ8 et M01 ont des effets beaucoup moins drastiques que les délétions pratiquées dans la région N-terminale de VP2. Le fait que chaque clone mutant soit infectieux nous a permis de nuancer les phénotypes et identifier des étapes possibles où le cycle viral était affecté. La préparation des stocks de chacun des mutants nous a suggéré qu'à long terme, la productivité était semblable d'un virus à l'autre.

Il est difficile d'affirmer qu'il y ait une différence quant au rapport d'équivalents génomiques par unité formatrice de foyer fluorescent (UFF). Des différences de l'ordre observé, peuvent être attribuées en grande partie à la marge d'erreur du PCR quantitatif. L'assurance qu'aucune différence marquée n'existe pour ce paramètre nous permet de considérer que les particules virales produites par chacun des clones infectieux sont également infectieuses dans les conditions utilisées. Comme les cellules sont lavées 1 heure après l'infection, il n'y aurait pas de différence significative lors des événements d'adhésion du virus à la cellule hôte.

Les différences observées lors des cinétiques d'infections ne sont pas beaucoup plus marquées, mais le nombre de données analysées augmente la fiabilité statistique des tendances observées. L'observation en immunofluorescence des cellules infectées au cours de la cinétique nous a révélé que la souche de PPV sauvage provenant du clone pN2 se propageait plus rapidement que les mutants. Étant donné l'apparition simultanée des premières cellules infectées lors des 28 premières heures pour tous les virus testés, la possibilité que l'entrée soit plus efficace chez le virus sauvage est peu probable. La différence se situe donc probablement à un moment ultérieur à la formation des protéines structurales, en l'occurrence l'assemblage ou la sortie du virus. Une observation surprenante a été faite pour un des deux puits du point de contrôle de 28 heures pour le virus MZ8 à MOI de  $5 \times 10^{-3}$ . L'amas de cellules infectées n'a pas été considéré comme un foyer d'infection étant donné qu'aucun autre foyer n'était observable pour ce virus dans le duplicata ou pour les deux points d'échantillonnage suivants.

Une autre possibilité envisageable est que l'avantage octroyé par la protéine X se manifeste uniquement sur la deuxième génération de cellules infectées. Ce serait le cas si la protéine X était une contre-mesure virale à l'action d'un mécanisme de défense inné des cellules, comme des interférons par exemple. Toutefois, les résultats obtenus lors des infections combinées démontrent qu'une infection préalable à faible MOI avec la souche sauvage ou une souche mutante n'indispose ni ne prédispose les autres cellules à une infection subséquente.

Les résultats d'immunofluorescence nous ont indiqué que la première génération de cellules infectées apparaissait au même moment d'un clone à l'autre. L'avantage de pN2 est gagné seulement avec l'apparition de la deuxième génération qui survient plus tôt que pour les mutants. Les titrages nous ont confirmé que les virus produits par le virus sauvage sont présents dans le surnageant en plus grand nombre dès 20 heures suivant l'infection et que la différence était jusqu'à 50 fois plus grande après 48 heures. Ces résultats reflètent assez bien une différence dans l'efficacité avec laquelle les virus sont produits ou relâchés.

La comparaison des effets cytopathiques causés par les différents virus sauvages et mutants nous amène à considérer sérieusement que le virus sauvage est plus efficacement relâché, si la lyse cellulaire est bel et bien le moyen utilisé par le virus pour sortir de sa cellule hôte. On note que l'effet cytopathique survient tout de même chez les mutants y compris MZ8 qui ne produit en principe aucune protéine X. Cela indique que cette protéine ne ferait qu'accélérer la lyse de la cellule. Le mécanisme d'action est cependant indéterminable. La possibilité que la mort des cellules survienne par apoptose n'a pas été vérifiée. Des fonctions pro-apoptotiques ont déjà été attribuées aux protéines non-structurales des parvovirus (Rayet *et al.*, 1998).

S'il existe une différence assez notable entre la souche sauvage et les souches mutantes, il est moins évident d'identifier une grande distinction entre les différents mutants eux-mêmes. Que ce soit lors de la cinétique ou des tests d'effet cytopathique, on

retrouve toujours la même tendance : le mutant MSER est celui dont le phénotype ressemble le plus au virus sauvage; la réplication de MZ8 est, en général, la moins efficace. Ces résultats sont consistants avec le fait que l'expression de la protéine X soit complètement abolie chez MZ8 alors qu'une certaine production de la protéine est possible chez MSER quoique probablement diminuée par rapport à pN2 en raison d'un contexte d'initiation plus optimal au premier codon AUG. Quant à M01, le plus déficient des trois mutants, son phénotype ne peut être entièrement attribué au changement du contexte d'initiation au codon AUG de VP2, puisque la mutation de la thymine en -3 par une adénine a aussi été effectuée chez MSER. Les deux autres nucléotides changés n'ont qu'un effet minime sur l'efficacité d'initiation (Kozak, 1987). Toutefois, le changement d'une sérine pour une thréonine à l'endroit du dernier acide aminé de la région unique de VP1 est possiblement la raison de la déficience accentuée. On sait que les sérines sont souvent phosphorylées lors de maturation post-traductionnelle des protéines virales. Maroto, Ramirez et Almendral (2000) ont d'ailleurs démontré l'importance de plusieurs sérines phosphorylées dans la partie N-terminale de VP2 du MVM et les déficiences de croissance observées chez les mutants ressemblaient considérablement à ceux que nous avons observés. Toutefois, il n'a pas été fait état de l'importance de telles sérines chez VP1. Il faut aussi considérer la présence d'un autre changement d'acide aminé, involontaire celui-là, sur la VP1 de M01, pour expliquer le phénotype aggravé de clone mutant.

Le cadre de lecture alternatif et la protéine X étant des éléments jamais évoqués dans la littérature des parvovirus, il est difficile de comparer nos résultats. Toutefois, il est intéressant de jeter un coup d'œil sur les résultats de Tullis, Burger et Pintel (1992) avec une nouvelle perspective. Le groupe de recherche a noté des déficiences dans la formation de plages de lyse en effectuant des mutations sur les acides aminés 17 à 23 de la protéine VP2 du MVM. Bien entendu, les mutations causées simultanément sur le cadre de lecture alternatif n'ont pas été considérées. Il est aussi intéressant de souligner que des problèmes d'effet cytopathique ont été observés chez les mêmes mutants. Sans remettre en question

l'exactitude et la pertinence des conclusions tirées alors par ce groupe de recherche, il est tentant de faire des associations entre nos résultats et les leurs.

## **CONCLUSION**

Il a été possible de déterminer à partir des expériences relatées dans ce mémoire, des séquences qui correspondent probablement à l'extrémité N-terminale de la protéine VP3. Cette information inédite jusqu'à maintenant pour la plupart des parvovirus devra cependant être consolidée en obtenant un signal de séquençage plus clair, ce qui devrait être réalisé en optimisant la méthode de production et de purification des particules de PPV.

Les résultats obtenus avec les mutants de délétions ont montré avec une grande certitude l'importance de la région unique de VP2. Ironiquement, la sévérité avec laquelle le phénotype fût affecté nous a empêché de déterminer à quel point du cycle de réplication cette portion de la capsid jouait un rôle. Il sera intéressant d'une part de construire une nouvelle série de mutants avec des délétions moins importantes et d'autre part, de retirer le codon d'initiation de la protéine X pour permettre une pleine expression de la VP2 tronquée, quitte à avoir le phénotype associé à la perte de cette protéine en arrière-plan.

Les mutations visant justement à modifier ou éliminer l'expression de cette protéine X ont conduit à des phénotypes marqués par une infectivité moins grande qui a été associée à une défektivité de la libération de la progéniture virale. Plus précisément, la lyse des cellules survient plus rapidement pour la souche sauvage que les mutants. La possibilité que les mécanismes d'apoptose soient impliqués est une hypothèse qu'il serait intéressant de vérifier. Les mutations indésirables qui sont probablement responsables du phénotype particulier de M01 donnent naissance à de nouvelles hypothèses qui pourraient alimenter de nouveaux projets. Le principal défi demeure quand même de prouver directement la présence de la protéine X lors de l'infection virale par immunofluorescence ou immunobuvardage. Ces deux techniques demandent cependant un anticorps spécifique à la protéine X. La mise au point d'un tel anticorps est en cours.

Les résultats obtenus au cours de ce projet de maîtrise ont permis de révéler des perspectives nouvelles sur des aspects peu connus de la biologie du parvovirus porcine, des perspectives qui pourrait être applicables également chez les autres membre de la famille

des *Parvoviridae*. Toutefois, les travaux effectués n'ont pas répondu entièrement à toutes les questions soulevées. Des projets futurs pourront être élaborés à cet effet. Par exemple, déterminer le rôle de la protéine X et de la maturation de Vpe en VP3.

## **REMERCIEMENTS**

Je voudrais d'abord remercier le Professeur Peter Tijssen pour m'avoir offert la possibilité de réaliser cette maîtrise au sein de son équipe et de m'avoir guidé tout au long de ce projet. Il en est de même pour le Professeur Jean-François Laliberté, mon co-directeur dont l'expertise m'a souvent profité.

Merci également au Dr Zoltan Zadori qui m'a enseigné les rudiments de la recherche en prenant mon projet sous son aile.

Je voudrais aussi exprimer ma gratitude à tous les membres du personnel et aux étudiants du laboratoire du Dr Tissen. Cela a été un plaisir de collaborer avec eux et de les cotoyer au cours de ces trois dernières années

Merci à Lise et Louise du service de séquençage pour leur excellent travail et aussi à France Dumas de l'IRB pour le séquençage de protéine.

Je voudrais saluer toute la communauté de l'IAF avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir.

Il aurait été impossible de poursuivre mes études graduées sans le support financier du FCAR, de la Fondation Armand-Frappier, de l'INRS-IAF ainsi que du Dr Tijssen.

Les derniers mais non les moindres : tous les membres de ma famille et mes amis qui seront toujours, pour moi, le soutien le plus important.

## RÉFÉRENCES

AGBANDJE M., R. McKenna, M.G. Rossmann, M.L. Strassheim, C.R. Parrish. 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. Proteins, vol. 16, no. 2, p. 155-171.

AGBANDJE M., S. Kajigaya, R. McKenna, N.S. Young, M.G. Rossmann. 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. Virology, vol. 203, no. 1, p. 106-115.

AGBANDJE M., C.R. Parrish, M.G. Rossmann. 1995. The structure of parvoviruses. Seminars in Virology, vol. 6, no. 5, p. 299-310.

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; Dans Handbook of Parvoviruses: P. Tijssen (ed). Boca Raton: CRC Press.

ASTELL C.R., M. Smith, M.B. Chow, D.C. Ward. 1979. Structure of the 3' hairpin termini of four rodent parvovirus genomes: nucleotide sequence homology at origins of DNA replication. Cell, vol. 17, no. 3, p. 691-703.

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

BALL-GOODRICH L.J., P. Tattersall. 1992. Two amino acids substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. Journal of Virology, vol. 66, no. 6, p. 3415-3423.

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., R.W. Compans. 1989. Polarized entry of canine parvovirus in an epithelial cell line. Journal of Virology, vol. 63, no. 7, p. 3164-3167.

BASAK S., H. Turner. 1992. Infectious entry pathway for canine parvovirus. Virology, vol. 186, no. 2, p. 368-376.

BASAK S., H. Turner, S. Parr. 1994. Identification of a 40- to 42-kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells. Virology, vol. 205, no. 1, p. 7-16.

- 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, no. 1, 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, no. 4, 2508- 2515
- BERNS K.I. 1996. Parvoviridae: The viruses and their replication. Dans Fundamental virology. 3<sup>e</sup> edition. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (ed). New-York : Lippincott-Raven.
- BROWN D.D., L.A. Salzman. 1984. Sequence homology between the structural proteins of Kilham rat virus. Journal of virology, vol. 49, no. 3, p. 1018-1020.
- BROWN K.E., S.M. Anderson, N.S. Young. 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. Science, vol. 262, p. 114-117.
- BOURGUIGNON G.J., P.J. Tattersall, D.C. Ward. 1976. DNA of minute virus of mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex. Journal of Virology; vol. 20, no. 1, p. 290-306.
- CARTER B.J., J.P. Trempe, E. Mendelson. 1990. Adeno-associated virus gene expression and regulation; Dans Handbook of Parvoviruses. P.Tijssen (ed). Boca Raton : CRC Press.
- 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. Veterinarian Microbiology, vol. 15, no. 1-2, p. 19-29.
- CLINTON G.M., M. Hayashi. 1975. The Parvovirus MVM: particles with altered Structural Proteins. Virology. Vol. 66, no. 1, p.163-168.
- CLINTON G. M., M. Hayashi. 1976. The Parvovirus MVM: A comparison of heavy and light particle infectivity and their density conversion in vitro. 1976. Virology. vol. 74, no. 1, p.57-63.
- CORMACK R.S., I.E. Somssish. 1997. Rapid amplification of genomic ends (RAGE) as a simple method to clone flanking genomic DNA. Gene, vol. 194, no. 22, p. 273-276.

COTMORE S.F., P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. Advances in Viruses 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, no. 5, p. 271-282.

COTMORE S.F., A.M. D'abramo Jr, C.M. Ticknor, P. Tattersall. 1999. Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particles disassembly. Virology, vol. 254, no. 1, p. 169-181.

DELEU L., F. Fuks, D. Spitkovsky, R. Horlein, S. Faisst, J. Rommelaere. 1998. Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells. Molecular Cell Biology, vol. 18, no. 1, p. 409-419.

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.

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.L. Gobble, J.F. Hokanson, D.C. Kradel, G.R. Bubash. 1965. Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. American Journal of Veterinarian Research, vol. 26, no. 115, p. 1284-1297.

FAUST E.A., D.C. WARD. 1979. Incomplete genomes of the parvovirus minute virus of mice: selective conservation of genome termini, including the origin for DNA replication. Journal of Virology, vol. 32, no. 1, p. 276-292.

FOX J.M., M.A. McCrackin Stevenson, M.E. Bloom. 1999. Replication of aleutian mink disease virus in vivo is influenced by residues in the VP2 protein. Journal of Virology, vol. 73, no. 10, p. 8713-8719.

GARDINER E.M., P. Tattersall. 1988. Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. Journal of virology, vol. 62, p. 1713-1722.

- GARIEPY S. 2000. «Interaction de la capside du parvovirus porcin avec son environnement ». Mémoire de maîtrise, Laval, INRS-IAF.
- GILLILAND G., S. Perrin, K. Blanchard, H.F. Bunn. 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proceedings of the National Academy of Science of the U S A, vol. 87, no. 7, p. 2725-2729.
- GRUENBERG J., G. Griffiths, K.E. Howell. 1989. Characterization of the early endosome and putative endocytic carrier vesicles in vivo and with an assay of vesicle fusion in vitro. Journal of Cell Biology, vol. 108, no. 4, p. 1301-1316.
- HABERHAUSEN G., J. Pinski, C. Kuhn, C. Markert-Hahn. 1998. Comparative study of different standardization concepts in quantitative competitive reverse transcription-PCR assays. Journal of Clinical Microbiology, vol. 36, no. 3, p. 628-633.
- HARDING M.J., T.W. Molitor. 1992. A monoclonal antibody which recognize cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. Archives of virology, vol. 123, no. 3-4, p. 323-333.
- HORIUCHI M., N. Ishiguro, H. Goto, M. Shinagawa. 1992. Characterization of the stage(s) in the virus replication cycle at which the host-cell specificity of the feline parvovirus subgroup is regulated in canine cells. Virology, vol. 189, no. 2, p. 600-608.
- HURTADO A., P. Rueda, J. Nowicky, J. Sarraseca, J.I. Casal. 1996. Identification of domains in canine parvovirus VP2 essential for the assembly of virus-like particles. Journal of Virology, vol. 70, no. 8, p. 5422-5429.
- JOO H.S., C.R. Donaldson-Wood, R.H. Johnsson. 1976. Observation of the pathogenesis of porcine infection. Archives of Virology, vol. 51, no. 1-2, p. 123-129.
- KAMSTRUP S., J. Langeveld, A. Botner, J. Nielsen, W.M. Schaaper, R.S. Boshuizen, J.I. Casal, P. Hojrup, C. Vela, R. Meloen, K. Dalsgaard. 1998. Mapping the antigenic structure of porcine parvovirus at the level of peptides. Virus Research, vol. 53, no. 2, p. 163-173.
- KOZAK M. 1987a. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. Journal of Molecular Biology, vol. 196, no. 4, p. 947-950.
- KOZAK M. 1987b. Effects of intercistronic length on the efficiency of reinitiation by eucaryotic ribosomes. Molecular Cell Biology vol. 7, no. 10, p. 3438-45.
- KOZAK M. 1991. An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. Journal of Cell Biology, vol. 115, no. 4, p. 887-903.

KOZAK M. 1995. Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. Proceedings of the National Academy of Science of the U S A, vol. 92, no. 15, p. 2662-2666.

KOZAK M. 1999. Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. Gene, vol. 234, no. 2, p. 187-208.

LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, vol. 227, no. 259, p.680-685.

LANGEVELD J.P.M., J.I. Casal, E. Cortes, G. van de Wetering, R.S. Boshuizen, W.M. Schaaper, K. Dalsgaard, R.H. Meleonen. 1994. Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of canine parvovirus as a synthetic peptide. Vaccine, vol. 15, p. 1473-1480.

LANGEVELD J.P., S. Kamstrup, A. Uttenthal, B. Strandbygaard, C. Vela, K. Dalsgaard, N.J. Beckman, R.H. Meleonen, J.I. Casal. 1995. Full protection in mink against mink enteritis virus with new generation canine parvovirus vaccines based on synthetic peptide or recombinant protein. Vaccine, vol. 13, no. 11, p. 1033-1037.

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., Rhode S.L. 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.

LI Y., J. Françoise-Xaviere, C. Giraud, F. Rolling, J. Quiot, M. Bergoin. 1996. A titration procedure of the *Junonia coenia* densovirus and quantitation of transfection by its cloned genomic DNA in four lepidopteran cell lines. Journal of Virological Methods, vol. 57, no. 1, p. 47-60.

LINSER P., H. Brunning, R.W. Armentrout. 1977. Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. Journal of Virology, vol. 41, no. 1, p. 211-221.

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.

MCKENNA R. N.H. Olson, P.R. Chipman, T.S. Baker, T.F. Booth, J. Christensen, B. Aasted, J.M. Fox, M.E. Bloom, J.B. Wolfenbarger, M. Agbandje-McKenna. 1999. Three-dimensional structure of aleutian mink disease parvovirus: implication for disease pathogenicity. Journal of Virology, vol. 73, no. 8, p. 6882-6891.

MAROTO B., J.C. Ramirez, J.M. Almendral. 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, no. 23, p. 10892-10902.

MAXWELL I.H., A.L. Spitzer, F. Maxwell, D.J. Pintel. 1995. The capsid determinant of fibrotropism for the MVMp strain of minute virus of mice functions via VP2 and not VP1. Journal of Virology, vol. 69, no. 9, p. 5829-5832.

MENGELING W.L., R.C. Cutlip. 1975. Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine foetus with porcine parvovirus. American Journal of Veterinarian Research, vol. 36, no. 8, p. 1173-1177

MENGELING W.L., J.F. Ridpath, A.C. Vorwald. 1988. Size and antigenic comparison among 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. 1983. Porcine Parvovirus : virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. Journal of virology, vol. 45, no.2, p.842-854.

MOLITOR T.W., H.S. Joo. 1990. Clinical and pathological features of Porcine-Parvovirus-related diseases and its diagnosis : Dans Handbook of Parvovirus: P.Tijssen (éd). Boca Raton : CRC press.

MULLER D.E., G. Siegl. 1983. Maturation of parvovirus LuIII in a subcellular system. II. Isolation and characterization of nucleoprotein intermediates. Journal of General Virology, vol. 64, no. 5, p. 1055-1067.

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., R.V. Schoborg, Q. Zhao, G.E. Tullis, D.J. Pintel. 1992. Nonsense mutations inhibit splicing of MVM RNA in cis when they interrupt the reading frame of either exon of the final spliced product. Genes and Development, vol. 6, no. 6, p. 1107-1119.

NAEGER L.K., N. Salome, 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, no. 2, p. 1034-1043.

ORAVEERAKUL K., C.S. Choi, T.W. Molitor. 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. Journal of Virology, vol. 66, no. 2, p. 715-722.

- PARADISO P.R. 1981. Infectious process of the parvovirus H-1 : Correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. Journal of Virology, vol. 39, no .3, p. 800-807.
- PARKER J.S.L., C.R. Parrish. 1997. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. Journal of Virology, vol. 71, no. 12, p. 9214-9222.
- 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.
- 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.
- PREVISANI N., S. Fontana, B. Ilirt, P. Beard. 1997. Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMp3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification : cell-specific differences in virus uncoating in vitro. Journal of Virology, vol. 71, p. 7769-7780.
- RAYET B., J.A. Lopez-Guerrero, J. Rommelaere, C. Dinsart. 1998. Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. Journal of Virology, vol. 72, no. 11, p. 8893-8903.
- RHODE S.L. III. 1973. Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. Journal of virology, vol. 11, no. 6, p. 856-861.
- RHODE S.L. III, S.M. Richard. 1987. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. Journal of virology, vol. 61, no. 9, p. 2807-2815
- 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.
- ROSSMANN M.G., J.E. Johnson. 1989. Icosahedral RNA virus structure. Annual Review in Biochemistry, vol. 58, p. 533-573.
- SCHOBORG R.S.V., D.J. Pintel. 1991. Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation, RNA processing and protein stability. Virology, vol. 181, no. 1, p. 22-34.

SHAW M.W., P.W. Choppin, R.A.Lamb. 1983. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. Proceedings of the National Academy of Science of the U S A., vol. 80, no. 16, p. 4879-4883.

SIEGL G. 1984. Biology of pathogenicity of autonomous parvovirus; dans The Parvoviruses: K. I. Berns (ed). New York : Plenum.

SIMPSON A, C.R. Parrish , Z. Zadori, P. Tijssen, M.G. Rossmann. 2001. Structure of Porcine Parvovirus and comparison to other parvoviruses. Soumis à Journal of Molecular Biology.

SPALHOLZ B.A., P. Tattersall. 1983. Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. Journal of Virology, vol. 46, no. 3, p. 937-943.

SPITZER A.L., C.R. Parrish, I.H. Maxwell. 1997. Tropic determinants for canine parvovirus and feline panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2. Journal of General Virology, vol. 78, no. 4, p. 925-928.

STEWART M. 1992. Nuclear pore structure and function. Seminars in Cell Biology, vol. 3, no. 4, p. 267-277.

STRASSHEIM M.L., A. Gruenberg, P. Veijalainen, J.Y. Sgro, C.R. Parrish. 1994. Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the threefold spike of the virus capsid. Virology, vol. 198, no. 1, p. 175-184.

STUDDERT M.J. 1990. Dans Handbook of Parvoviruses: P. Tijssen (ed). Boca Raton: CRC Press.

Tattersall P. 1972. REPLICATION OF THE PARVOVIRUS MVM. I. DEPENDENCE OF VIRUS MULTIPLICATION AND PLAQUE FORMATION ON CELL GROWTH. JOURNAL OF VIROLOGY, VOL. 10, NO. 4, P. 586-590.

TATTERSALL P., P.J. Cawte, A.J. Shatkin, D.C. Ward. 1976. Three structural polypeptides coded for by minute virus of mice, a parvovirus. 1976. Journal of Virology, vol. 20, no. 2, p. 273-289.

TATTERSALL P., A.J. Shatkin. 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., S. Cotmore. 1988. Parvovirus and Human Diseases : J.R. Pattison (éd), Boca Raton : CRC press.

TENNANT R.W., K.R. Layman, R.E. Hand Jr. 1969. Effect of cell physiological state on infection by rat virus. Journal of Virology, vol. 4, p.872-878.

TIJSSEN P., J. Bergeron, R. Dubuc, B. Hébert. 1995. Minor genetic change among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. Seminars in Virology, vol. 6, no. 5, p. 319-328.

TRESNAN D.B., L. Southard, L. Weichert, J.Y. Sgro, C.R. Parrish. 1995. Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and the canyon regions of the canine parvovirus capsid. Virology, vol. 211, no. 1, p. 123-132.

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. 1992. The trypsin-sensitive domain in the capsid proteins of minute virus of mice is required for efficient cell binding and viral infection but for proteolytic processing in vivo. Virology, vol. 191, no. 2, p. 846-857.

TULLIS G.E., L.R. Burger, D.J. Pintel. 1993. The minor capsid protein Vp1 on the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation 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. Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanism. Seminars in Virology, vol. 6, no. 5, p. 291-298.

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., A. Kalela, P. Makinen, L. Kakkola, V. Marjomaki, M. Vuento. 1998. Intracellular route of canine parvovirus entry. Journal of Virology, vol. 72, no. 1, p. 802-806.

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.

WILLIAMS M.A., R.A. Lamb. 1989. Effect of mutations and deletions in a bicistronic mRNA on the synthesis of influenza B virus NB and NA glycoproteins. Journal of Virology, vol. 63, no. 1, p. 28-35.

WILLWAND K., B. Hirt. 1991. The minute virus of mice capsid specifically recognizes the 3' hairpin structure of the viral replicative-form DNA: mapping of the binding site by hydroxyl radical footprinting. Journal of Virology, vol. 65, no. 9, p. 4629-4635.

WU, H., M.G. Rossmann. 1993. The canine parvovirus empty capsid structure. Journal of Molecular Biology, vol. 233, no. 2, p. 231-234.

XIE Q., M.S. Chapman. 1996. Canine parvovirus capsid structure analysed at 2.9 Å resolution. Journal of Molecular Biology, vol. 264, no. 3, p. 497-520.

ZADORI Z., J. Szelei, M. Lacoste, Y. Li, S. Gariepy, P. Raymond, M. Allaire, I.R. Nabi, P. Tijssen. 2001. A viral phospholipase A<sub>2</sub> is required for parvovirus infectivity. Developmental Cell, vol. 1, no. 2, p. 291-302.