

Université du Québec
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

**LES CAPSIDES RECOMBINANTES DE DENSOVIRUS COMME PLATE-
FORME POUR LA PRÉSENTATION D'UN ÉPITOPE
DU VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL HUMAIN**

Par
MAUD DAVID

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en virologie
Septembre 2001

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr. Denis Leclerc Centre de Recherche en Infectiologie CHUQ, Pav. CHUL, Université Laval
Examineur interne	Dr. Suzanne Lemieux Santé humaine
Directeur de recherche	Dr. Peter Tijssen Microbiologie et biotechnologie
Codirecteur de recherche	Dr. Michel Trudel Santé humaine

De nos jours, la plupart des vaccins utilisés sont encore faits de virus vivants ou inactivés. Des atténuations insuffisantes ou des inactivations incomplètes constituent toujours un risque pour la santé des êtres humains ou des animaux. De récentes stratégies ont procuré de nouvelles approches pour créer des vaccins sécuritaires. Depuis quelques années, les baculovirus retiennent l'attention quant à leur capacité d'exprimer de grandes quantités de protéines mimant la protéine virale authentique. Le densovirus de la larve *Galleria mellonella* est un petit virus eucaryote non enveloppé avec une capsidie d'environ 22 nm de diamètre. Son génome est fait d'ADN monocaténaire linéaire ambisens de 6 kb. L'expression du gène VP4 du densovirus *GmDNV*, codant pour la protéine de capsidie (VP), dans les cellules d'insectes grâce à l'utilisation du système du baculovirus permet de produire des capsidies recombinantes formées par l'auto-assemblage des VP4. Ces capsidies recombinantes ont été utilisées pour présenter un épitope protecteur du virus respiratoire syncytial humain (VRSH) au système immunitaire. Le VRSH est l'agent causal le plus important des maladies virales des voies respiratoires inférieures chez les nouveau-nés et les enfants en bas-âge. Malgré l'importance des infections et des dommages causés par ce virus, il n'existe toujours pas de vaccin sécuritaire et efficace pour la protection des enfants. L'épitope inséré est constitué des acides aminés 173-187 de la glycoprotéine de surface virale G qui est un antigène viral majeur. L'épitope a été inséré à un endroit stratégique à la surface de la capsidie, soit en C-terminal de VP4.

Grâce à plusieurs analyses la présence du peptide inséré sur les capsidies recombinantes a pu être détectée. Malheureusement, lors de l'évaluation de l'activité protectrice de l'épitope exprimé à la surface des capsidies recombinantes de *GmDNV* dans un modèle animal aucune réponse immunitaire contre le pathogène VRSH n'a pu être détectée.



Étudiante



Directeur de recherche

Remerciements :

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr. Peter Tijssen ainsi que mon co-directeur Dr. Michel Trudel pour leur support scientifique tout au long de ma maîtrise. Je voudrais également remercier le Dr. Yi Li pour son aide précieuse dans le laboratoire ainsi que tous les autres membres du laboratoire. Merci à l'institut Armand-Frappier de m'avoir permis d'y faire mes études graduées. Je remercie mon père, Charles, et ma mère, Marilyn, pour leur soutien continu. Ma grande sœur Caroline pour son aide et ses conseils ainsi que mon conjoint Bruce pour m'avoir encouragée dans les moments de découragement. Merci à mes deux petits trésors Antoine et Justine qui me font toujours garder le sourire.

Sommaire

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	3
1. LES GÉNÉRALITÉS	4
1.1 Historique	4
1.2 Pathologies du <i>GmD</i> NV	4
1.3 Caractérisation du <i>GmD</i> NV.....	5
2. CLASSIFICATION DES PARVOVIRUS ET ORGANISATION DU GÉNOME	5
2.1 Densovirus	6
2.2 Brevidensovirus	9
2.3 Iteravirus	9
2.4 Bidentsovirus	9
3. SPECTRE D'HÔTE	10
4. CARACTÉRISTIQUES DU VIRION.....	10
4.1 Propriétés du virion.....	10
4.2 Propriétés biochimiques.....	11
4.3 Propriétés antigéniques.....	12
5. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES DENSOVIRUS.....	12
5.1 Nature du génome.....	12
5.2 Transcription des gènes d'insectes	13
5.3 Transcription et traduction des gènes de DNV	13
5.4 Réplication des DNV	14
6. PRODUITS DU GÉNOME	15
6.1 Protéines non-structurales.....	15
6.2 Protéines structurales	15
7. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE	16
7.1 En général	16
7.2 Échange de domaine	22
7.3 Les boucles chez le <i>GmD</i> NV.....	27
7.4 Interactions des sous-unités	27
8. PARTICULES VIRALES RECOMBINANTES VIDES (VLPs)	31
9. LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL HUMAIN (VRSH)	37

9.1 Généralités	37
9.2 Les glycoprotéines de surface du VRS	38
9.2.1 La glycoprotéine F	38
9.2.2 La glycoprotéine G.....	41
9.3 Immunité.....	42
9.3.1 Immunité à médiation cellulaire	43
9.3.2 Immunité humorale.....	43
10. LES VACCINS.....	43
10.1 Vaccin inactivé	44
10.2 Vaccin atténué.....	44
10.3 Vaccin peptidique (sous-unitaire).....	45
MÉTHODOLOGIE.....	48
1. MÉTHODE DE CLONAGE	49
1.1 La réaction en chaîne en présence de polymérase (PCR)	49
1.1.1 Description du PCR	49
1.1.2 Choix des amorces pour amplification de la VP4	49
1.1.3 Composante de la réaction.....	52
1.1.4 Analyse de l'ADN en gel d'agarose	52
1.2 Clonage	53
1.2.1 Purification de l'ADN.....	53
1.2.2 Vecteur.....	53
1.2.3 Digestion.....	56
1.2.4 Ligation.....	56
1.3 SÉLECTION DES CLONES POSITIFS	57
1.3.1 Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	57
1.3.2 Milieux de culture et géloses	58
1.3.3 Méthode rapide UFX (Cormack et Somssich, 1997).....	58
1.4 Séquençage	59
2. PRODUCTION DU BACMIDE RECOMBINANT	59
2.1 Transformation d' <i>Escherichia coli</i> (DH10Bac) pour la transposition.....	59
2.2 Extraction de l'ADN du bacmide recombinant	64
3. PRODUCTION DU BACULOVIRUS RECOMBINANT	65
3.1 Transfection de cellules Sf9 avec l'ADN du bacmide recombinant.....	65
3.2 Amplification du baculovirus recombinant	66
3.3 Conservation des baculovirus recombinant	67
3.4 Titrage du baculovirus recombinant	67
3.4.1 Préparation des plaques	67
3.4.2 Coloration au rouge neutre	68
3.4.3 Calcul du titre	69
4. EXPRESSION DES PROTÉINES	69
4.1 Optimisation de l'expression	69
4.2 Expression des protéines en flacon.....	69
4.3 Infection de cellules en suspension dans un fermenteur	70

5. PURIFICATION DES PROTÉINES	70
5.1 Purification à partir du surnageant	70
5.1.1 Mise au culot des protéines (capsides recombinantes)	70
5.1.2 Dépôt des protéines sur gradient de CsCl	71
5.2 Purification à partir des cellules	71
6. MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES	71
6.1 Électrophorèse de protéines sur minigel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)	71
6.1.1 Gel de polyacrylamide (Ausubel <i>et al.</i> , 1987)	73
6.1.2 Montage de l'appareil et coulage des gels	73
6.1.3 Préparation des échantillons et chargement de ceux-ci	73
6.1.4 Électrophorèse des protéines	74
6.2 Coloration des protéines au bleu de Coomassie	74
6.3 Transfert de protéines et immunobuvardage	74
6.3.1 Préparation des divers tampons	75
6.3.2 Montage de l'appareil de transfert (Owl Scientific, Inc.)	75
6.3.3 Révélation des protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose	76
6.4 Dosage protéique par la méthode de Bradford	76
6.5 Microscopie électronique	76
6.5.1 Coloration négative	76
6.5.2 Immunodétection à l'or colloïdal	77
6.6 Immunofluorescence	77
7. ÉTUDES DE LA STABILITÉ DES CAPSIDES FORMÉES DE VP4-VRS SOUMISES À DIFFÉRENTS FACTEURS	77
7.1 Choix d'une protéase	78
7.2 Stabilité des capsides soumises à la trypsine	78
7.3 Stabilité des capsides à différents pH	78
7.4 Stabilité des capsides à différentes concentrations de NaCl	79
7.5 Stabilité des capsides à différentes températures dans le temps	79
7.6 Stabilité des capsides au gel/dégel	79
8. ÉVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOGÈNE ET DE PROTECTION DE LA CAPSIDE RECOMBINANTE PORTANT LA RÉGION 174-187 DE LA GLYCOPROTÉINE G VRS	79
8.1 Souris	79
8.2 Immunisation	80
8.3 ELISA	80
8.3.1 Prélèvement des sérums	80
8.3.2 Préparation de l'antigène ELISA	80
8.3.3 Procédure	81
8.4 Test de protection	81
8.4.1 Épreuve virale	81
8.4.2 Évaluation du niveau de protection	81

RÉSULTATS	83
1. EXPRESSION DES CAPSIDES RECOMBINANTES FORMÉES DE LA VP4 DU <i>GmD</i> NV PORTANT L'ÉPITOPE G DU VRS	84
1.1 PCR pour amplification de la VP4 de <i>GmD</i> NV	84
1.2 Transposition	84
1.3 Transfection de cellules Sf9.....	87
1.4 Passage sur cellules High5.....	87
1.4.1 Vérification de la présence de capsides en microscopie électronique	87
1.4.2 Vérification de la présence de l'épitope sur les capsides recombinantes par immunobuvardage de type Western.....	92
1.4.3 Détection des cellules infectées par immunofluorescence indirecte.....	92
1.4.4 Détection de l'épitope sur les capsides par immunomarquage indirect à l'or colloïdal.	92
1.5 Amplification des baculovirus recombinants et titrage	92
1.6 Expression des protéines dans les cellules High5.....	97
1.7 Purification des protéines par CsCl	97
1.7.1 Comparaison des deux bandes du gradient de CsCl par SDS-PAGE, immunobuvardage et microscopie électronique	97
1.8 Dosage protéique par la méthode de Bradford	100
2. ÉTUDES DE STABILITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES SOUMISES À DIFFÉRENTS FACTEURS	100
3. ÉTUDES DE L'IMMUNOGÉNÉICITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES	108
3.1 Évaluation de l'immunogénicité des capsides recombinantes de DNV formées de VP4 et présentant l'épitope G du VRS	108
DISCUSSION	111
1. EXPRESSION DES CAPSIDES RECOMBINANTES FORMÉES DE LA VP4 DU <i>GmD</i> NV PORTANT L'ÉPITOPE PROTECTEUR G DU VRSH DANS UN SYSTÈME D'EXPRESSION BACULOVIRAL.....	112
2. ÉTUDES DE STABILITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES SOUMISES À DIFFÉRENTS FACTEURS	116
3. ÉTUDE DE L'IMMUNOGÉNÉICITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES.....	117
CONCLUSION	119
BIBLIOGRAPHIE	121

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I : Position des C-alphas dans la pointe des boucles et à l'extrémité C-terminale	30
TABLEAU II : Immunité humorale des souris immunisées avec les capsides recombinantes ..	110
TABLEAU III : Évaluation de la protection des souris immunisées avec les capsides recombinantes	110

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : Structure générale des trois genres de la sous-famille des Densovirinae	7
FIGURE 2 : Représentation d'un icosaèdre avec les axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5	18
FIGURE 3 : Microscopie cryoélectronique de la capsid du <i>GmDNV</i>	20
FIGURE 4 : Structure de la protéine structurale VP4 du <i>GmDNV</i>	23
FIGURE 5 : Association des sous-unités dans le virion du <i>GmDNV</i>	25
FIGURE 6 : Représentation par diagramme des repliements du polypeptide du <i>GmDNV</i>	28
FIGURE 7 : Anneau β autour de l'axe de rotation 3	32
FIGURE 8 : Représentation des spicules sur le VRSH ainsi que sa glycoprotéine G	39
FIGURE 9 : Amorces utilisées dans les réactions de PCR.....	50
FIGURE 10 : Stratégie de clonage.....	54
FIGURE 11 : Amorces utilisées lors du séquençage	60
FIGURE 12 : Transposition.....	62
FIGURE 13 : PCR et digestions	85
FIGURE 14 : Microscopie électronique sur les capsides recombinantes de densovirus	88
FIGURE 15 : Immunobuvardage sur les capsides recombinantes.....	90
FIGURE 16 : Immunofluorescence indirecte sur cellules High5	93
FIGURE 17 : Immunomarquage à l'or	95
FIGURE 18 : Comparaison des bandes du gradient de CsCl	98
FIGURE 19 : Courbes de dosage des protéines.....	101
FIGURE 20 : SDS-PAGE pour l'étude de la stabilité des capsides recombinantes soumises à différents facteurs	104

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å	: armstrong
a.a.	: acide aminé
ADN	: acide désoxyribonucléique
AaPV	: <i>Aedes albopictus</i> parvovirus
AaeDNV	: <i>Aedes aegypti</i> densovirus
AAV	: virus Adeno-associé
AcNPV	: <i>autographa californica</i> nuclear polyhedrosis virus
AeDNV	: <i>aedes</i> densovirus
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
ATP	: adénosine triphosphate
BmDNV	: <i>bombyx mori</i> densovirus
BSA	: "bovine serum albumine"
CeDNV	: <i>casphalia extranea</i> densovirus
CPV	: canine parvovirus
CsCl	: chlorure de cesium
Cys	: cystéine
Da	: dalton
DICT ₅₀	: dose infectieuse sur culture de tissus
dNTP	: deoxy nucleoside triphosphate
DNV	: densovirus
DsDNV	: <i>diatraea saccharalis</i> densovirus
DTT	: dithiothreitol
EDTA	: éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	: "enzyme-linked-immunosorbent-assay"
g	: gramme
GmDNV	: <i>galleria menollena</i> densovirus
h	: heure
ICTV	: "the international committee on taxonomy of viruses" (comité international de taxonomie des virus)
Ig	: immunoglobuline
IPTG	: isopropyl thio-galactoside
ITR	: "inverse terminal repeat" (répétitions terminales inversées)
JcDNV	: <i>junonia coenia</i> densovirus
Kb	: kilobase
KDa	: kiloDalton
KV	: kilovolt
LB	: milieu de Luria-Bertani
LCMV	: lymphocytic choriomeningitis virus
mL	: millilitre
mm	: millimètre
mM	: millimolaire
MOI	: "multiplicity of infection" (multiplicité d'infection)

N	: normal
ng	: nanogramme
nm	: nanomètre
NS	: “non structural protein” (protéine non structurale)
nts	: nucléotides
o/n	: “over night” (toute la nuit)
ORFs	: “open reading frame” (cadres de lecture ouverts)
P	: passage
PBS	: “phosphate buffer saline”
Pb	: paire de bases
PCR	: “polymerase chain reaction” (réaction de polymérisation en chaîne)
Pfu	: plaque forming unit
<i>Pi</i> DNV	: pseudoplusia includens densovirus
pMol	: picomole
psi	: pounds per square inch (livre par pouce carré)
PTA	: acide phosphotungstique
RPM	: rotation par minute
SDS	: sodium dodecyl sulfate
TAE	: tris acetate EDTA
TE	: tampon tris-EDTA
U	: unité
µg	: microgramme
µL	: microlitre
µm	: micromètre
VLP	: “virus-like particles” (particules recombinantes vides)
VP	: “viral protein” (protéine de capsid)
VRSH	: virus respiratoire syncytial humain

INTRODUCTION

La vaccination a été la méthode la plus efficace pour mettre fin aux maladies virales chez les humains et les animaux. Il y a un besoin constant de développer des vaccins sécuritaires. De nos jours, la plupart des vaccins utilisés sont encore faits de virus vivants ou inactivés. Des atténuations insuffisantes ou des inactivations incomplètes constituent toujours un risque pour la santé des êtres humains ou des animaux. De récentes stratégies ont procuré de nouvelles approches pour créer des vaccins sécuritaires. Depuis quelques années, les baculovirus retiennent l'attention quant à leur capacité d'exprimer de grandes quantités de protéines mimant la protéine virale authentique. Le densovirus de la larve *Galleria mellonella* est un petit virus eucaryote non enveloppé avec une capsid e d'environ 22 nm de diamètre. Son génome est fait d'ADN monocaténaire linéaire ambisens de 6 kb. L'expression du gène VP4 du densovirus *GmDNV*, codant pour la protéine de capsid e (VP), dans les cellules d'insectes grâce à l'utilisation du système du baculovirus permet de produire des capsides recombinantes formées par l'auto-assemblage des VP4.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont pour but d'évaluer le potentiel de ces particules vides (*GmDNV*) pour la présentation d'un épitope protecteur du virus respiratoire syncytial humain (VRSH) au système immunitaire. Le VRSH est l'agent causal le plus important des maladies virales des voies respiratoires inférieures chez les nouveau-nés et les enfants en bas-âge. Malgré l'importance des infections et des dommages causés par ce virus, il n'existe toujours pas de vaccin sécuritaire et efficace pour la protection des enfants.

L'épitope inséré est constitué des acides aminés 173-187 de la glycoprotéine de surface virale G qui est un antigène viral majeur. L'épitope est inséré à un endroit stratégique à la surface de la capsid e, soit en C-terminal de VP4. Ces particules devraient éventuellement induire une forte réponse immunitaire contre le pathogène VRSH. Les capsides recombinantes produites étant destinées à être purifiées afin d'être en mesure d'évaluer, dans un modèle animal, l'activité protectrice de l'épitope exprimé à la surface des capsides recombinantes de *GmDNV*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LES GÉNÉRALITÉS

1.1 Historique

Le premier rapport d'une maladie d'insecte causée par un densovirus (DNV) remonte au début des années 1960. Le Laboratoire de Pathologie Comparée, un centre de référence pour le diagnostic de pathogènes d'invertébrés, à Saint Christol-lez-Alès en France, a reçu un échantillon d'une larve de *Galleria mellonella* mourante venant d'une culture en masse de cet insecte comme appât pour la pêche (Bergoin et Tijssen, 1998). Les larves montraient des symptômes de paralysie progressive, de flaccidité et de dépigmentation du cuticule, suivis de leur mort 4 à 5 jours après l'apparition des premiers symptômes (Meynadier *et al.*, 1964; Vago *et al.*, 1964, 1966a).

1.2 Pathologies du *GmDNV*

Les effets histopathologiques du densovirus *GmDNV* ont été intensivement étudiés. Des investigations histologiques et ultrastructurales ont révélé que les larves souffraient d'un syndrome, jusqu'ici inconnu, caractérisé par une coloration de l'ADN avec le réactif de Feulgen révélant la présence de noyaux fortement positifs, hypertrophiés dans différents tissus, qui prédominaient plus dans les cellules adipeuses (Amargier *et al.*, 1965; Vago *et al.*, 1964). Il s'agissait d'un agent viral responsable d'un nouveau syndrome, la denonucléose, caractérisée par l'hypertrophie des noyaux de cellules qu'il infecte. Des analyses plus approfondies ont révélé que le *GmDNV* présentait un large tropisme tissulaire, il était donc polytrophe. Il infecte à peu près tous les tissus larvaires, à l'exception de l'épithélium de l'intestin moyen où aucune lésion n'a jamais été décelée dans les larves de *GmDNV* infectées. Les tissus adipeux, l'hypoderme, les tissus musculaires, les cellules péritrachéales, les glandes séricigènes, les tubules de malpighi, les oenocytes, l'épithélium de l'intestin antérieur et postérieur et les hémocytes sont les tissus les plus sévèrement affectés par le virus (Vago *et al.*, 1964; Amargier *et al.*, 1965; Bergoin et Bres, 1968; Kurstak et Vago, 1968).

Sur sections ultraminesces, le noyau grandement grossi apparaît rempli avec un stroma virogénique dense aux électrons contenant des milliers de petites particules isométriques. En regard à ces caractéristiques, le nouveau syndrome a été désigné "virose à noyaux denses" (maladie virale formant des noyaux denses) d'où la provenance du nom virus de la denonucléose

et plus tard du nom densovirus (Vago *et al.*, 1966b). Ce virus était si virulent et contagieux que l'élevage de larves *G. mellonella* est devenu problématique pour plus d'un an.

1.3 Caractérisation du *GmDNV*

De petites particules (20-22 nm) icosahédrales non-enveloppées contenant de l'ADN ont été isolées et purifiées à partir de larves mortes (Vago *et al.*, 1964, 1966 A; Truffaut *et al.*, 1967) et des analyses subséquentes biophysiques et biochimiques du virion ont montré qu'il était fait de quatre polypeptides structuraux et qu'il contenait une molécule linéaire d'ADN simple brin d'environ 6 kb (Tijssen *et al.*, 1976; Barwise et Walker, 1970; Vernoux et Kustak, 1972). Ce virus semblait donc partager les traits principaux des parvovirus autonomes répliatifs et défectifs des vertébrés et a donc été classifié comme un nouveau genre, *Densovirus*, dans la famille des *Parvoviridae* (Bachmann *et al.*, 1975). Le nom parvovirus vient du latin parvus qui signifie petit (Kurstak *et al.*, 1977).

2. CLASSIFICATION DES PARVOVIRUS ET ORGANISATION DU GÉNOME

Les parvovirus sont parmi les plus petits et plus simples virus à ADN eucaryotes. La famille des *Parvoviridae* se divise en deux sous-familles : celle des *Parvovirinae*, virus de vertébrés, et celle des *Densovirinae* constituée de virus qui infectent les invertébrés. Selon le 6^{ème} rapport de l'ICTV, on fait allusion à 3 genres dans la sous-famille des *Densovirinae* mais certaines observations font croire qu'il y en aurait quatre (Murphy *et al.*, 1995). Les trois genres acceptés sont : *Densovirus*, *Brevidensovirus* et *Iteravirus*, ces derniers se répartissent en 3 types en fonction d'une part de l'organisation génomique des séquences codantes et d'autre part, par la structure de leurs extrémités (Tijssen et Bergoin, 1995). Pour obtenir une nomenclature uniforme des DNVs, ils ont été identifiés par les deux lettres de l'abréviation du nom de leur hôte, comme *GmDNV* pour le DNV de *Galleria mellonella*.

Le clonage et le séquençage de plusieurs DNV durant la dernière décennie ont grandement contribué à une meilleure compréhension de la biologie de ces virus à un niveau moléculaire (Bando *et al.*, 1990 (*BmDNV*); Tijssen 1994 (RÉSULTATS NON PUBLIÉS) (*GmDNV*); Afanasiev *et al.*, 1991 (*AeDNV*); Dumas *et al.*, 1992 (*JcDNV*); Boublik *et al.*, 1994 (*AaPV*)).

L'analyse des séquences des DNVs n'a pas seulement révélé une grande diversité dans leur organisation génomique, mais elle a aussi démontré, par la découverte de motifs de séquences hautement conservés dans les génomes de parvovirus de vertébrés et d'insectes, qu'ils provenaient d'un ancêtre commun (Bando *et al.*, 1987). Comme les génomes de parvovirus de vertébrés, certains DNVs séquencés possèdent des séquences palindromiques à leurs extrémités, certaines étant des répétitions terminales inversées (ITRs), d'autres non. La séquence de leur extrémité 3' est telle qu'elle peut former une structure en épingle à cheveux qui peut servir d'amorce pour la réplication de l'ADN passant par la formation d'une forme répllicative double brin requise pour l'initiation de la transcription. Les génomes des DNVs, comme ceux des parvovirus de vertébrés, contiennent deux séries de cadres de lecture ouverts (ORFs) (généralement grands), un pour les protéines non structurales (NS) et l'autre, pour les protéines structurales (VP) (Bergoin et Tijssen, 1998).

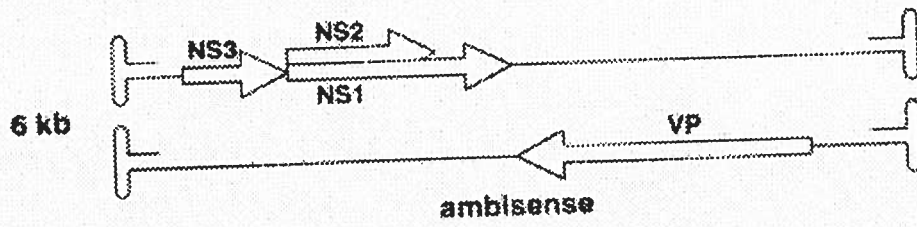
La structure générale des génomes des DNVs, jusqu'à maintenant reconnue dans la sous-famille des *Densovirinae*, est montrée dans la figure 1 (Tijssen et Bergoin, 1995).

2.1 Densovirus

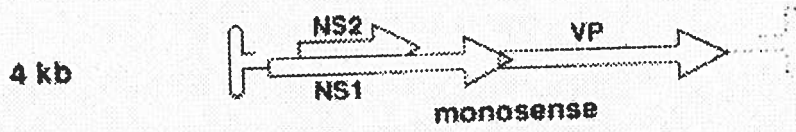
Le génome du *GmDNV* (ainsi que *JcDNV*, *DsDNV*, *MIDNV* et *PiDNV*) appartient au genre *Densovirus*. Ce genre inclut les DNVs qui ont un génome d'ADN simple brin ambisens d'une taille avoisinant les 6 kb. Ces séquences codantes se répartissent sur les deux brins complémentaires qui sont séparément encapsidés. La moitié 5' terminale des deux brins contient des cadres de lecture ouverts. Donc, un brin porte le cadre de lecture ouvert majeur (ORF1) codant pour les protéines structurales (VP), l'autre brin portant en 5' trois cadres de lecture ouverts (ORF2, ORF3 et ORF4) codant pour les trois protéines non structurales NS1, NS2 et NS3. La moitié de la population virale contient les brins "+" et l'autre moitié les brins "-". Ces brins ont de très longues répétitions terminales inversées (ITR) (520-550 nts) dont les 100-140 nucléotides terminaux forment la structure en Y palindromique. Cette même structure d'épingle à cheveux est typique pour tous les parvovirus et sert pour la conversion du génome du simple-brin en double-brin, nécessaire pour la transcription, et pour la réplication.

FIGURE 1 : Structure générale des trois genres de la sous-famille des *Densovirinae*. Les *Densovirus* ont un génome ambisens et porte les gènes de VP sur le brin complémentaire à celui qui porte les gènes de NS. Les deux autres genre *Brevidensovirus* et *Iteravirus* un un génome monosens.

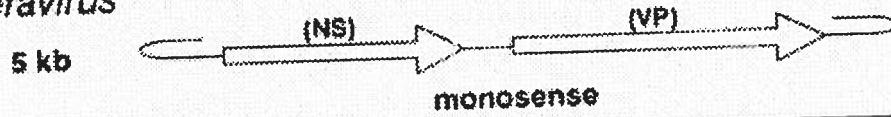
DENV



BREVDENV



ITERAVIRUS



2.2 Brevidensovirus

Ce genre renferme les DNVs avec un génome monosens dont la taille est d'environ 4 kb, soit les AaeDNV et AalDNV. Donc, les séquences codantes sont portées sur le même brin. L'ORF de gauche codant pour NS1 contient dans un autre cadre de lecture la séquence de la protéine non structurale NS2 et l'ORF de droite code pour les protéines de capsides (VP). Comme les *Densovirus*, leurs terminaisons génomiques sont capables de former des structures en forme de Y qui servent d'amorce lors de la réplication. Mais, au contraire des *Densovirus*, ils n'ont pas de répétitions terminales inversées (Afanasiev *et al.*, 1991; Boublik *et al.*, 1994). L'autre différence réside dans le fait que le brin "-" est davantage encapsidé (dans environ 90% des cas) (Tijssen et Bergoin, 1995).

2.3 Iteravirus

Les propriétés de ce genre, dont le prototype est le *BmDNV-I*, sont moins bien établies. Les *Iteravirus* ont un génome monosens dont les cadres de lecture ouverts sont localisés sur le même brin, mais l'attribution des protéines à chacun de ces cadres reste à être confirmée. Les séquences codantes seraient réparties en deux ORFs, l'ORF des protéines non structurales (NS) à gauche, l'ORF des protéines structurales (VP) à droite. Les répétitions terminales inversées sont beaucoup plus courtes (environ 200 pb) que celles des densovirus de lépidoptère à génome ambisens (Bando *et al.*, 1987, 1990) et ne forment pas de structure en forme de Y mais elles ont toutefois de vraies épingles à cheveux. Ce génome se répliquerait comme les dépendovirus (Berns, 1991). *CeDNV* (*Casphalia extranea*) semble faire partie de ce genre, mais d'autres données sont requises pour leur classification définitive (Fedièrre *et al.*, 1991; Bergoin, résultats non publiés).

2.4 Bidensovirus

Un autre groupe de densovirus a été nommé Bidensovirus par Tijssen et Bergoin (1995). Ce genre a été proposé à cause du virus *BmDNV-2* qui a un génome bipartite duquel les brins complémentaires, mais probablement les 2 segments du génome sont séparément encapsidés (Bando *et al.*, 1992). Les génomes de ces virus ne portent pas des épingles à cheveux et, conséquemment, ont un mécanisme de transcription et réplication différents des parvovirus. Alors, ils ne sont pas considérés comme parvovirus.

3. SPECTRE D'HÔTE

Le Densovirus *GmD* semble être spécifique à son hôte d'origine. En dépit d'une forte virulence pour les invertébrés, les densovirus ne semblent pas pathogènes pour les vertébrés supérieurs et pour l'homme (Giran, 1966; Jousset *et al.*, 1993). Il est incapable de se répliquer dans les vertébrés ou mammifères, incluant les humains (Bergoin et Tijssen, 1998). Comme il a été démontré, l'inoculation de souris et de lapins avec les DNVs pour préparer des anti-sérums n'a induit aucune condition pathologique. De plus, aucune répllication de DNVs dans les lignées cellulaires de vertébrés n'a été démontrée jusqu'ici, malgré plusieurs efforts. Les virus *GmD*, *AaPV/AalD* et *AaeD* n'ont produit aucun effet pathogénique lorsque inoculés intracérébralement dans des souris nouveau-nées (Giran, 1966; Jousset *et al.*, 1993). Le petit génome des parvovirus peut expliquer leurs spécificités d'hôtes considérables, car pour plusieurs de leurs fonctions, ils dépendent de la cellule hôte (Kurstak *et al.*, 1977).

4. CARACTÉRISTIQUES DU VIRION

4.1 Propriétés du virion

Les parvovirus sont parmi les plus petits virus à ADN (Siegl *et al.*, 1985). Les virions de densovirus ont l'aspect de particules parasphériques sans enveloppe de diamètre compris entre 19 et 26 nm. Les DNV auraient un diamètre de 21-23 nm selon Amargier 1965, 19-20 nm sur section ultramince de tissus selon Vago 1966a tandis que Kurstak et Côté 1969 rapportent un diamètre moyen de 20 ± 1.5 nm en coloration négative. Ce désaccord pourrait être expliqué par le choix de la technique utilisée ou par le fait que le DNV est un virus hétérogène constitué de 2 types de population DNV-I et DNV-II (Tijssen *et al.*, 1977).

Aucune différence majeure entre les ADN de DNV-I et DNV-II n'a été observée, donc la différence résiderait dans la capsid (Tijssen et Kurstak, 1979b). Le DNV-II serait le résultat de la dégradation de DNV-I car sur gradient de chlorure de césium (CsCl) on retrouve peu de particules entre les 2 bandes formées par DNV-I et DNV-II et de plus, on ne retrouve dans aucune particule une densité plus élevée (Tijssen et Kurstak, 1979b). Donc, les deux types diffèrent par leur contenu en protéines et par l'équilibre de forces qui déterminent leur structure quaternaire (Tijssen *et al.*, 1977).

La masse moléculaire des virions est comprise entre $5,5$ et $6,2 \times 10^6$ Da pour les particules pleines et $4,2 \times 10^6$ Da pour les particules vides (Siegl *et al.*, 1985). Leur densité apparente en gradient de CsCl varie entre $1,40$ g/ml (Truffaut *et al.*, 1967; Tijssen *et al.*, 1977) et $1,44$ g/ml (Hoggan, 1971; Tijssen *et al.*, 1977), la bande majeure étant située à $1,40$ g/ml (Tijssen *et al.*, 1990). La microscopie électronique des suspensions virales purifiées a révélé un mélange de particules pleines avec une constante de sédimentation variant de $111s$ à $119s$ et de capsides sans acide nucléique avec une constante de sédimentation de $59s$ à $89s$ (Longworth *et al.*, 1968; Kelly *et al.*, 1977; Meynadier *et al.*, 1977 a; Meynadier *et al.*, 1977 b; Tijssen *et al.*, 1977; Longworth, 1978).

Les densovirus sont constitués essentiellement de protéines et d'ADN dans les proportions de $2/3$ et $1/3$ de leur masse (Longworth *et al.*, 1968; Meynadier *et al.*, 1977 b). La capside est composée de quatre polypeptides principaux (Tijssen *et al.*, 1976) soit : VP1 (89kDa), VP2 (58 kDa), VP3 (53 kDa) et VP4 (47 kDa) (Bergoin et Tijssen, 1998).

La structure de la capside du GmDENV a été établie récemment avec une résolution à $3,7 \text{ \AA}$ par la technique de diffraction aux rayons X et de cryomicroscopie électronique. La capside est composée de 60 sous-unités monomériques disposées en pentamère aux douze sommets de l'icosaèdre (Simpson *et al.*, 1998); ce sujet sera abordé en profondeur un peu plus tard.

4.2 Propriétés biochimiques

Les densovirus, ainsi que les parvovirus en général sont très stables. Les particules virales résistent à des pH compris entre 3 et 9 (Blacklow et Cukor, 1985), et ne sont pas sensibles aux solvants organiques comme l'éther et le chloroforme (Boemare *et al.*, 1970), ce qui est logique considérant l'absence de lipides essentiels dans le virion. De plus, il y a très peu ou pas de glucidiques dans le virion d'ADN (Siegl *et al.*, 1985). Ils sont résistants à une température de 56°C pour 60 minutes (Boemare *et al.*, 1970; Suto, 1979; Siegl *et al.*, 1985; Blacklow et Cukor, 1985) et restent viables quatre ans à la température pièce.

Les virus résistent à l'inactivation par la DNase, mais toutefois, ils peuvent être inactivés par traitement au formol, à la β -propiolactone ou à l'hydroxylamine et aux agents oxydants (Siegl *et al.*, 1985).

4.3 Propriétés antigéniques

Aucune réaction croisée par fixation du complément et par anticorps fluorescents entre 8 parvovirus autres et le DNV n'a été observée (Hoggan *et al.*, 1966). Le DNV n'agglutine pas les érythrocytes de cobaye, de rats et les globules rouges humain de type O (Hoggan *et al.*, 1966).

5. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES DENSOVIRUS

5.1 Nature du génome

Le *GmDNV* possède un génome d'ADN linéaire simple brin de 6 kb qui représente environ le tiers de la masse totale du virion. La nature ADN du génome du *GmDNV* fut mise en évidence pour la première fois en 1967 par l'équipe de Truffaut. Le génome extrait du virus montrait des caractéristiques typiques d'un génome double brin, mais avait le double de la masse attendue soit environ 4×10^6 Da (2×10^6 dans le virion) (Tijssen *et al.*, 1990a). L'hypothèse était que les brins complémentaires étaient séparément encapsidés mais qu'ils s'assemblaient lors de l'extraction. Barwise et Walker en 1970 ont montré que l'ADN extrait du virus avait une masse moléculaire qui était le double de l'ADN encapsidé dans les virus. Donc, ils ont conclu que l'ADN de différentes particules virales étaient complémentaires. Cette observation était supportée par le fait que la masse moléculaire apparente de l'ADN déduite par son comportement de sédimentation était le double de celle de l'ADN qui se trouvait dans les virus. Donc, *GmDNV* devait exister en population mixte de particules chacun contenant un brin complémentaire d'ADN qui se trouvait dans une conformation partiellement simple brin. Lors de l'isolement, sous des conditions appropriées, les molécules d'ADN simple brin complémentaire s'associent donc et forment une molécule d'ADN double brin. Les DNVs encapsident les brins des deux polarités à fréquences égales (Siegl *et al.*, 1985).

5.2 Transcription des gènes d'insectes

Les gènes d'insectes peuvent différer considérablement des gènes de mammifères par le nombre d'introns. Les introns sont plus rares dans les gènes d'invertébrés. De façon similaire, aucun intron n'a encore été trouvé dans les gènes de DNV (M. Bergoin et P. Tijssen, résultats non publiés). L'autre différence majeure avec les gènes de mammifères est trouvée parmi les facteurs de transcription (Bergoin et Tijssen, 1998).

5.3 Transcription et traduction des gènes de DNV

La plupart des promoteurs de NS et VP des densovirus ambisens se trouvent dans les ITRs, avec la boîte TATA dans la séquence répétée terminale et la boîte CAGT dans la séquence unique. Ces promoteurs génèrent des transcrits de 2.4 kb (NS) et 2.6 kb (VP) (M. Bergoin, résultats non publiés). Pour *GmDNV*, le transcrit de VP est polyadénylé 41 nucléotides en amont du codon de terminaison NS, menant à un ARN antisens de 61 nucléotides (P. Tijssen, résultats non publiés). On connaît très peu concernant la régulation temporelle des gènes de DNV. NS1 pourrait être impliqué dans la transcription temporelle des ORFs viraux de DNVs (Bergoin et Tijssen, 1998).

Les Densovirus, en tout cas pour *GmDNV* et *JcDNV*, n'utilisent pas d'épissage alternatif pour réguler l'expression des gènes comme le font les parvovirus de vertébrés (Cotmore et Tattersall, 1987; Bergeron *et al.*, 1996; Bergoin, résultats non publiés; Tijssen, résultats non publiés). Aucun épissage de transcrit primaire n'a été observé pour ces DNVs (M. Bergoin et P. Tijssen, résultats non publiés). Les densovirus ont développé une stratégie alternative pour exprimer les gènes se chevauchant et pour réguler le degré d'expression de chacun des gènes (Tijssen et Bergoin, 1995). Par exemple, les gènes de protéines structurales de *GmDNV* et *JcDNV* constituent un ensemble emboîté d'unités de transcription sur le même ARN (Tijssen, résultats non publiés). Pour *GmDNV*, un mécanisme de balayage imparfait des ribosomes ("leaky scanning") a été observé pour la traduction (P. Tijssen, résultats non publiés). Un seul transcrit VP de 2.6 kb porte l'information pour les quatre VPs (Bergoin et Tijssen, 1998). Le balayage par les ribosomes pour les codons d'initiation ATG et l'extension à laquelle leur environnement est favorable déterminent la fraction des ribosomes initiant à ces codons. Le site

d'initiation de traduction pour VP1 est situé exceptionnellement près de l'extrémité 5' du transcrit et seulement une petite fraction (1-4 %) des ribosomes le reconnaît (Tijssen et Bergoin, 1995). La plupart passe au deuxième codon ATG. Par contre, l'environnement de ce codon d'initiation n'est pas favorable, et seulement 20% des ribosomes y débute la traduction pour VP2. La même situation existe au prochain site d'initiation de VP3. Tous les ribosomes restant commencent la traduction au site de VP4 (Bergoin et Tijssen, 1998). Ce mécanisme peut-être étudié avec le système d'expression du baculovirus et l'efficacité aux différents codons d'initiation imité par des petits changements dans les séquences en amont (P. Tijssen, résultats non publiés). Le site de début de traduction pour VP4 comporte en fait 2 sites d'initiation - MAM- les 2 étant de forts initiateurs de transduction dans un système d'expression baculoviral indépendant (Bergoin et Tijssen, 1998). Ce système permet de produire des capsides vides à partir de chacun des sites d'initiation de la traduction, ces capsides sont nommées VLPs pour "Virus-Like Particles" ou particules recombinantes vides. Le sujet des VLPs sera abordé plus loin.

La nature ambisens de ce virus impose que la transcription soit exécutée sur les 2 brins. Les 2 boîtes TATA, qui déterminent le départ de la transcription, sont localisées dans les terminaisons répétées. Des signaux putatifs pour une régulation temporelle des gènes NS et VP doivent donc être localisés dans la séquence unique en aval de la boîte TATA.

5.4 Réplication des DNV

La réplication de l'ADN des DNVs a reçu peu d'attention. L'ADN linéaire simple brin du génome des DNVs est relativement inhabituel parmi les virus d'invertébrés. Cet ADN est caractérisé par deux traits proéminents : (1) la séquence palindromique terminale qui sert d'amorce pour la réplication de l'ADN et à maintenir l'intégrité des séquences terminales, et (2) sa réplication par un mécanisme de déplacement du simple brin par l'ADN polymérase δ (Bergoin et Tijssen, 1998).

Les membres des densovirus ont des ITRs qui, du point de vue de la structure des ITRs, sont similaires à ceux des virus Adeno-associés (AAV) (appartenant au genre *Dependovirus* des

parvovirus de vertébrés. L'ADN des *Densovirus* se réplique probablement par le mécanisme de "rolling-hairpin" suggéré pour les AAV (Berns, 1991), car ces deux virus contiennent des brins d'ADN simple brin séparément encapsidés (Kurstak *et al.*, 1973). Par contre, le DNV fait une répllication autonome contrairement aux AAVs (Kurstak, 1972). Comme prédit dans ce modèle, les deux terminaisons semblent exister en 2 séquences alternatives, "flip" et "flop" (P.Tijssen, N-P). Pour transférer les "hairpins" après la répllication, résultant en une conversion flip-flop, et pour maintenir l'intégrité des terminaisons du génome une "nickase" site-spécifique est requise. NS1 contiendrait les motifs appropriés pour être cette enzyme qui se lie via les résidus tyrosine dans le site II à l'extrémité 5' de l'ADN coupée et fonctionnerait comme une hélicase pour permettre les réparations des épingles à cheveux du brin donneur (Bergoin et Tijssen, 1998).

6. PRODUITS DU GÉNOME

6.1 Protéines non-structurales

À ce jour, les protéines non structurales des densovirus n'ont pas fait l'objet de nombreuses recherches. On connaît très peu concernant ces protéines codées par le cadre de lecture ouvert des NS. La protéine NS majeure (en taille) semble avoir des fonctions qui sont analogues à la NS1 des parvovirus de vertébrés en ce qui à trait aux motifs pour l'ATPase (superfamille III des hélicases) qu'elle contient et aux activités de protéines initiatrices qui sont requises pour résoudre la forme répllicative intermédiaire.

6.2 Protéines structurales

Pour la plupart des parvovirus, la masse moléculaire d'ensemble des quatre types de protéines virales excède grandement la capacité totale codante du génome viral (Tijssen *et al.*, 1976). Les quatre protéines structurales de *GmDNV* ont des homologies de séquences très grandes comme le démontre la cartographie peptidique (Tijssen et Kurstak, 1979a; Tijssen et Kurstak, 1981; Moore et Kelly, 1980) et de plus, elles montrent une forte relation antigénique (Tijssen et Kurstak, 1981). Même si les virions partagent la plupart des propriétés biophysiques et biochimiques avec les virions de parvovirus de vertébrés, ils diffèrent en ayant une capsid composée de 4 protéines VP1, VP2, VP3 et VP4 (Tijssen *et al.*, 1976). La capsid du *GmDNV* se compose de quatre polypeptides structuraux appelés: VP1, VP2, VP3 et VP4 de masse

moléculaire décroissante de 89 kDa, 58 kDa, 53 kDa et 47 kDa (Bergoin et Tijssen, 1998). Ces polypeptides ne sont pas en proportion équimolaire, ils se présentent dans un rapport 1:9:9:41 (VP4 étant le plus abondant) et font environ 70% de la masse du virion (Tijssen *et al.*, 1990). Les protéines de capsid ne contiennent aucun pont disulfure entre les protéines, car l'omission de β -mercaptoéthanol n'a aucun effet sur la dissociation du virion par le SDS (Tijssen *et al.*, 1981). Aucune modification post-transcriptionnelle des protéines générées n'a été observée (Tijssen *et al.*, 1990). Des résultats non publiés ont démontré qu'aucun résidu glucidique n'était attaché à ces capsides (Tijssen, résultats non publiés). La séquence nucléotidique démontre que les VPs pourraient former des séries emboîtées, lesquelles co-terminent à l'extrémité carboxyle des protéines. Récemment, il a été démontré dans le laboratoire du Dr. Peter Tijssen que chacune des VPs exprimée dans le système du baculovirus pouvait former des capsides vides sans l'aide d'aucune autre protéine. Les capsides recombinantes exprimées sont de grosseur égale au virion natif, avec les mêmes propriétés antigéniques, mais ces dernières ne contiennent pas l'ADN viral.

7. MORPHOLOGIE ET STRUCTURE

7.1 En général

Les particules virales sont un merveilleux exemple d'architecture à l'échelle moléculaire. La fonction primaire de la capsid est avant tout la protection du génome. Des interactions protéine-protéine maintiennent les capsides stables de façon surprenante. L'économie génétique fait en sorte que des structures sont formées à partir de copies identiques d'un petit nombre de protéines virales. Ces molécules de protéines sont arrangées pour donner le maximum de contact. La façon la plus économique de construire une capsid symétrique de volume interne maximal avec des molécules de protéines non-symétriques est d'arranger les protéines en des structures triangulaires équilatérales qui sont jointes pour former un icosaèdre (Flint *et al.*, 2000). Un icosaèdre est une structure géométrique qui comprend 20 triangles équilatéraux arrangés autour de la face d'une sphère. Chacun de ces triangles est formé par l'assemblage de 3 sous-unités, donc le nombre total de sous-unités de protéines dans la capsid est 60. La symétrie icosaédrale permet la formation d'une capsid fermée avec le plus petit nombre (60) de sous-unités identiques. Dans un tel arrangement, ces sous-unités sont reliées les unes aux autres par les axes de rotation d'ordre 2, 3 et 5 qui définissent la symétrie icosaédrale (figure 2).

Il y a 6 axes de symétrie d'ordre 5 à chacun des 12 sommets où 5 sous-unités font un contact de symétrie 5. Il y a 10 axes d'ordre 3 s'allongeant au travers de chaque face et 15 axes de symétrie d'ordre 2 passant au travers des arêtes de l'icosaèdre. À l'axe de symétrie 2, la rotation d'un objet de 180° lui donne une apparence identique à celle qu'il avait à la position de départ; à l'axe 3, des rotations de 120° et 240° restaurent l'apparence de départ et des rotations de 72°, 144°, 216° et 288° autour de l'axe 5 restaurent l'identité. Dans une structure icosaédrale simple, les interactions de toutes les molécules avec leurs voisines sont identiques.

En 1976, Tijssen *et al.*, suggèrent que toutes les capsides de parvovirus sont constitués de 60 molécules de protéine par virion, dont chaque virion est formé de 12 pentamères, chacun étant constitué de 5 protéines structurales. Ce n'est qu'au cours de cette dernière décennie que la structure tri-dimensionnelle de plusieurs parvovirus (CPV, FPV, B19, MVM et *GmDNV*) a été déterminée en cristallographie à rayons X par l'équipe du Dr. Michael Rossmann (Tsao *et al.*, 1991; Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996; Agbandje *et al.*, 1993; Agbandje *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1994; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998 et Simpson *et al.*, 1998). Des analyses en cristallographie à rayon X et en microscopie cryoélectronique de *GmDNV* à une résolution d'environ 0,375 nm (collaboration de P.Tijssen et du groupe de M.G. Rossmann à l'université de Purdue) révèlent un icosaèdre de 24.5 nm caractérisé par les axes de symétrie rotationnels typique 2, 3 et 5 (figure 3).

Comme il a été mentionné plus tôt, chez le *GmDNV* il y a quatre différents sites d'initiation de la traduction des ARNm pour les protéines de la capside des densovirus, qui donnent les protéines virales VP1 à VP4. Dans le *GmDNV*, les protéines virales VP1, VP2, VP3 et VP4 sont présentes dans le virion dans un rapport approximatif de 1 :9 :9 :41 pour un total de 60 sous-unités par particule (Tijssen *et al.*, 1976; Tijssen et Kustak, 1981). Ces protéines ont toutes la même extrémité C-terminale et contiennent 811, 535, 488 et 437 acides aminés

FIGURE 2 : Représentation d'un icosaèdre avec les axes rotationnels d'ordre 2, 3 et 5 qui définissent la symétrie icosaédrale. Les axes rotationnels d'ordre 2 sont représentés par des cercles rouges. Les axes rotationnels d'ordre 3 sont représentés par des triangles verts. Enfin, les axes rotationnels d'ordre 5 sont représentés par des pentagones bleus.

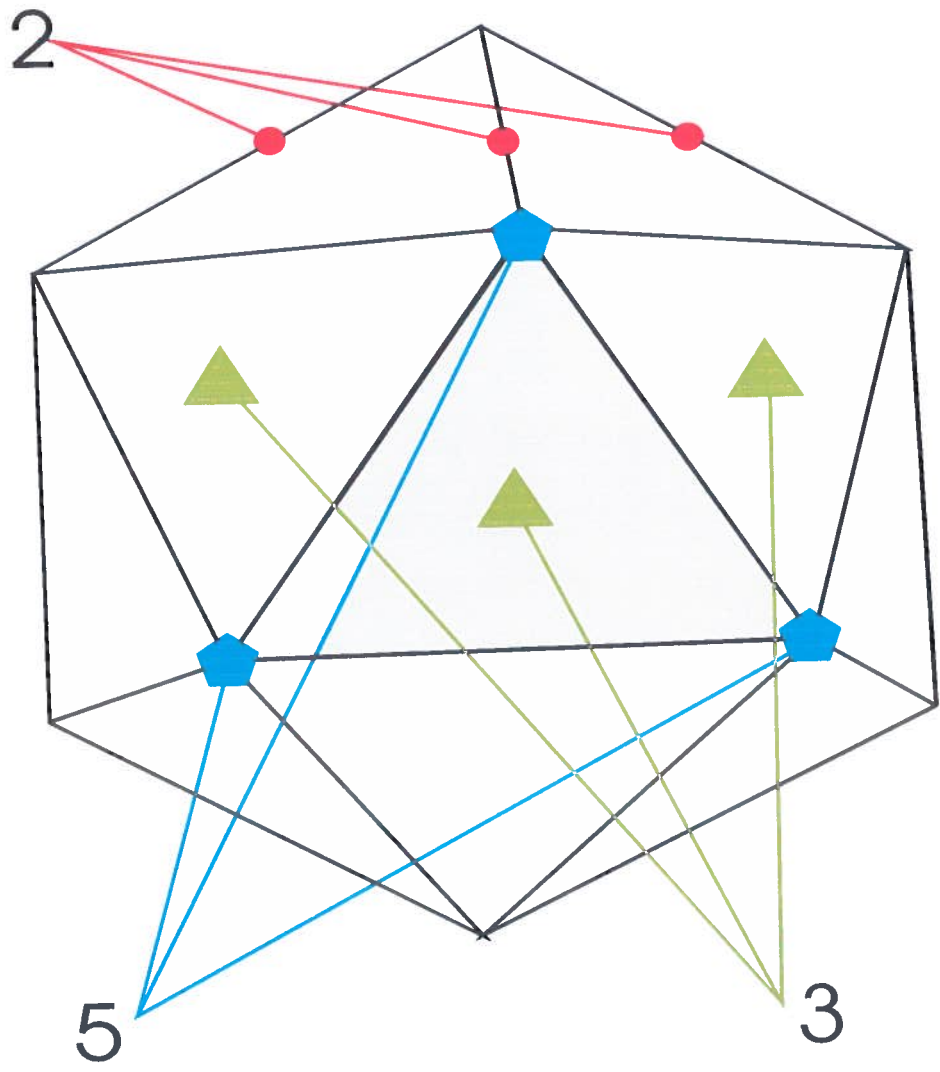
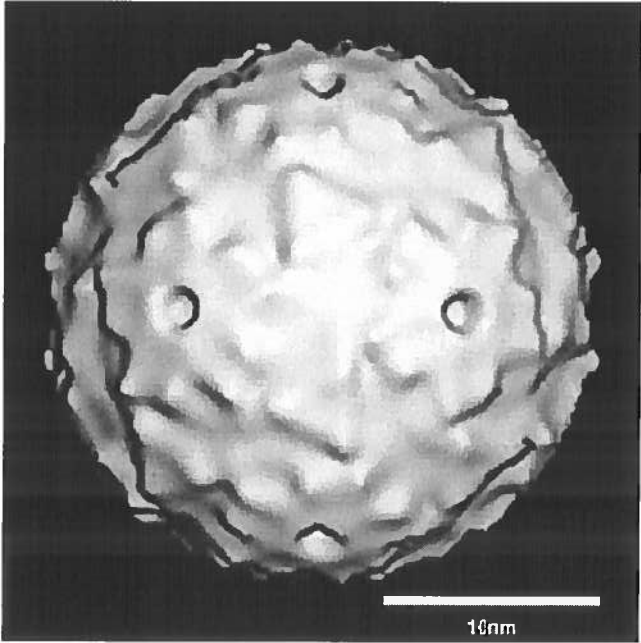


FIGURE 3 : Microscopie cryoélectronique de la capsidie du *GmD*NV. On peut remarquer la forme d'un icosaèdre de 24.5 nm caractérisé par les axes de symétrie rotationnels typiques 2 (centre) , 3 (centre de petits triangles en haut et en bas du centre) et 5 (à gauche et à droite du centre). La mesure indiquée définit une échelle de 10 nm (Simpson *et al.*, 1998).



respectivement. Soixante copies du domaine C-terminal commun composent la plus grande partie de la capsidie icosaédrale. Au coeur des protéines de capsides du densovirus *GmDNV* on retrouve des motifs de baril- β , similaires à ceux retrouvés dans plusieurs autres protéines de capsides virales. La structure ressemble intimement à celle des parvovirus de vertébrés, mais elle a divergé dans plusieurs des régions à longue boucle qui constituent le trait distinctif de sa surface et les contacts entre les sous-unités (Simpson *et al.*,1998).

Les niveaux d'expression relatifs des protéines de capsides sont contrôlés par un mécanisme de balayage imparfait des ribosomes pour des sites d'initiation alternatif des ribosomes.

Simpson *et al.* (1998), ont présenté pour la première fois la structure d'un parvovirus d'insecte par résolution atomique. La structure du *GmDNV* a été interprétée par un patron de densité d'électron de 3,7 Å, ce qui représente la moyenne pour les icosaèdres. La chaîne principale a été tracée à partir des résidus 22 à 436 de la VP4 (figure 4a). La structure tertiaire "fold" consiste en un coeur de domaine baril- β comme on retrouve dans plusieurs autres protéines de capsides virales et consiste aussi en plusieurs insertions de longues boucles. Dans le *GmDNV*, les brins β sont reliés par de longues boucles (plus de 100 résidus), lesquelles forment la plupart des contacts entre les sous-unités aussi bien que les caractéristiques de surfaces de la capsidie.

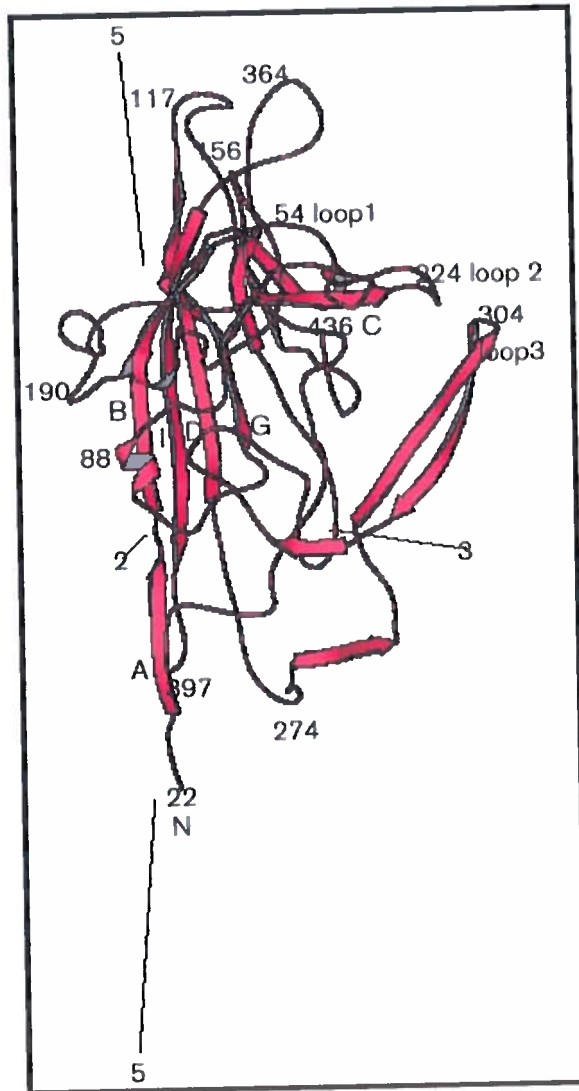
7.2 Échange de domaine

Le baril- β est composé de deux feuillets 'BIDG' et 'CHEF'. Le feuillet 'BIDG' est composé des brins antiparallèles β B, β I, β D et β G (figure 4a et 4b) (Simpons *et al.*,1998). Le brin β A est essentiellement une extension linéaire du brin β B . Le brin β A fait un lien hydrogène avec le brin β B de la sous-unité avoisinante de l'axe 2, c'est-à-dire celle qui se trouve en face de lui et permet donc leur interaction (figure 4b et 5a). Ceci est un exemple d'échange de domaine, car le domaine d'une protéine est substitué par le même domaine d'une protéine identique de symétrie reliée, ici le brin β A. L'échange de domaine peut promouvoir

FIGURE 4 : Structure de la protéine structurale VP4 du *GmD*NV.

A. Représentation de la structure tertiaire de la VP4 à partir de ces résidus 22 à 436, celle-ci consiste en un coeur de domaine baril- β . **B.** Représentation de la structure secondaire de la VP4 avec ces feuillets β et de l'échange de domaine. Un côté du baril- β est composé des brins antiparallèles β B, β I, β D et β G, qui forment le feuillet 'BIDG'. L'autre côté on retrouve le brin β A dont le brin β B est une extension linéaire de celui ci. Simpson *et al.*, 1998.

A.



B.

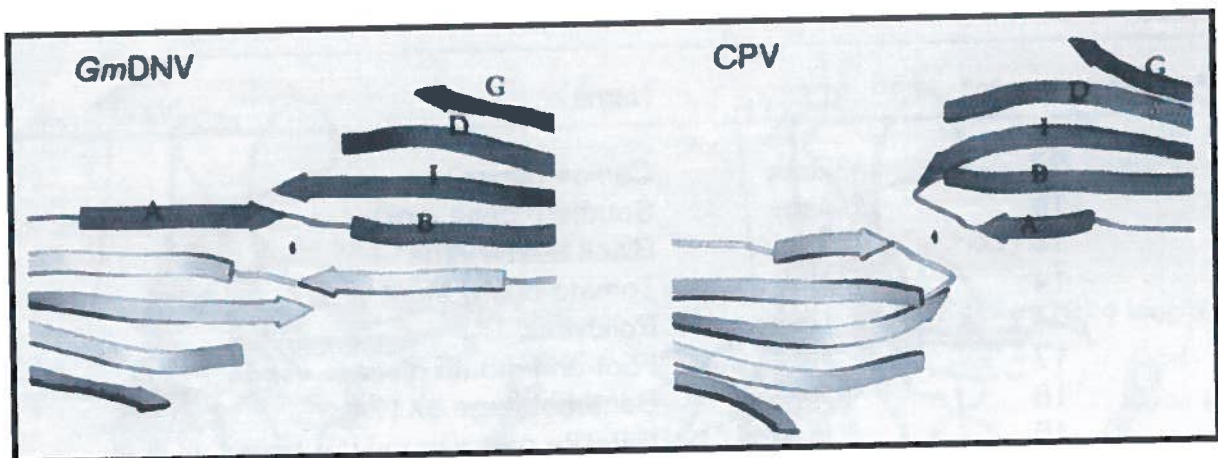
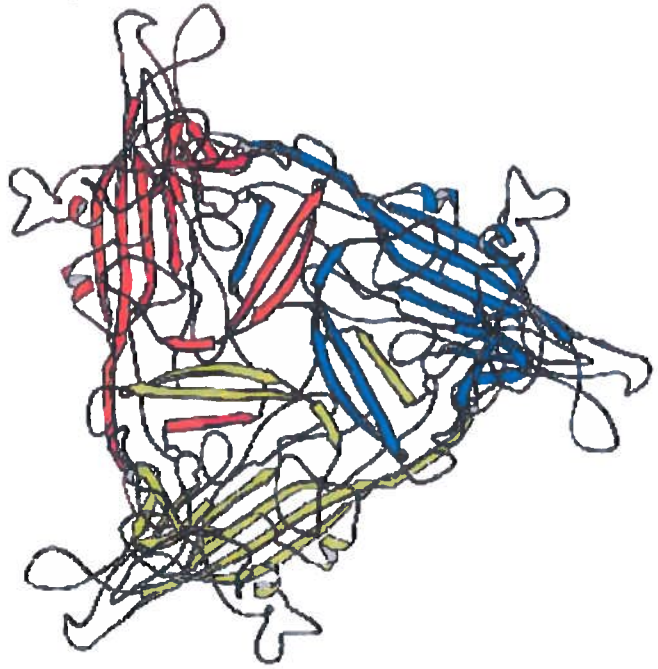


FIGURE 5 : Association des sous-unités dans le virion du *GmDNV*. L'orientation des sous-unités rouges est approximativement la même dans chacun des angles de vue ainsi que dans la figure 4a. **A.** Le contact principal entre les sous-unités reliées par l'axe rotationnel d'ordre 2 est l'extrémité N-terminal du brin β A. **B.** La boucle 3 des sous-unités avoisinantes génère la plupart des contacts à l'axe autour de l'anneau β . **C.** Les contacts générés à l'axe 5 sont moins intenses que les contacts aux axes 2 et 3. Au contre de l'axe 5 on retrouve un tunnel.

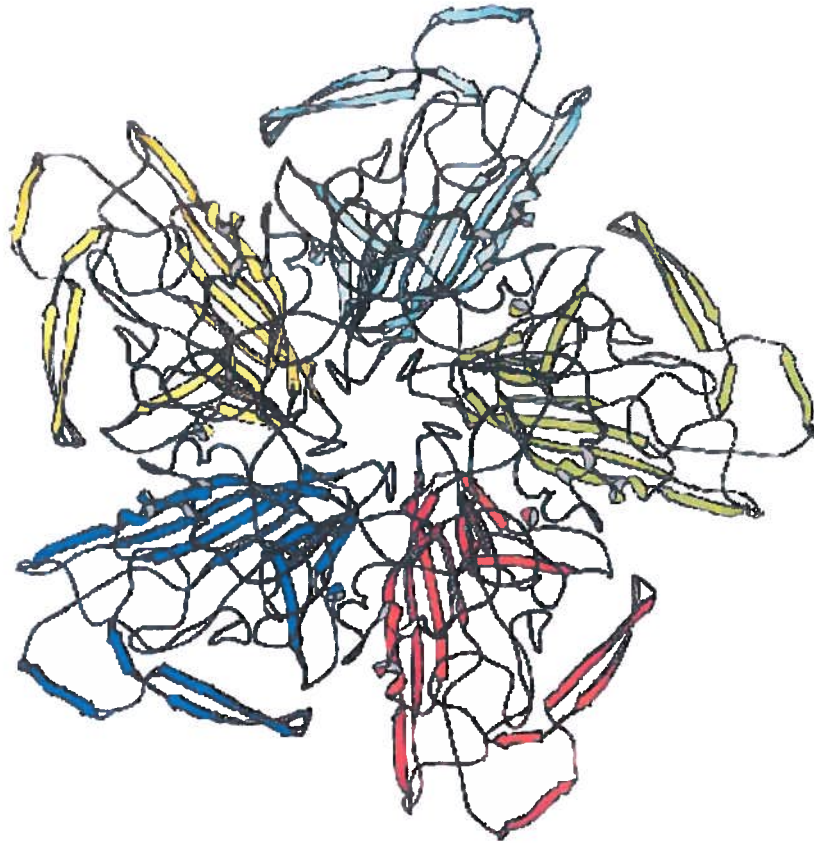
A.



B.



C.



l'oligomérisation des sous-unités par la modification d'une interface existante plutôt que de l'évolution d'une nouvelle (Bennett *et al.*, 1995).

Par contre, chez les parvovirus de vertébrés (ex. CPV), l'extrémité N de β A se retrouve près de l'axe 5; son extrémité C tourne donc en β B près de l'axe 2 et forme un feuillet antiparallèle 'ABIDG' (figure 4b). Donc, chez le *GmDNV* le brin β A est la structure échangée ce qui n'est pas le cas chez le CPV. Donc, le brin β A n'interagit pas avec l'autre sous-unité car il se trouve de l'autre côté et non en face de lui.

7.3 Les boucles chez le *GmDNV*

Les brins de la structure en baril- β sont reliés par de larges boucles, ces boucles forment elles-mêmes une grande partie de la structure des capsides et sont plus souvent qu'autrement localisées en surface virale. Le *GmDNV* compte 3 boucles, la boucle 1 comprend 24 a.a. entre les brins β B et β C; la boucle 2 est formée de 101 résidus entre les brins β E et β F; et la boucle 3 émerge des 96 a.a. joignant les brins β G et β H (figure 6).

Grâce à la connaissance des positions des C- α de chacun des résidus à la surface des boucles, il est possible de connaître la distance des résidus à partir du centre du virion. La position la plus surélevée à la surface de la capsid se trouve à être le résidu 175, qui est un acide aspartique. Le dernier résidu de l'extrémité carboxy-terminale, soit le résidu 437, est une valine qui se retrouve aussi à la surface de la capsid (Tableau I).

7.4 Interactions des sous-unités

Les 60 sous-unités de la capsid virale sont présentes de façon uniforme tout le tour de la capsid grâce à la symétrie icosaédrale de celle-ci et à ces axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5 qui permettent aux 60 sous-unités d'interagir ensemble.

Dans la capsid assemblée du *GmDNV*, 45 % de la région de la surface accessible au solvant du monomère (25,381 Å) est cachée. Ceci est distribué entre les contacts créés par les

FIGURE 6 : Représentation par diagramme des repliements du polypeptide du *GmDNV*. Les numéros correspondent au commencement et à la fin des éléments de structure secondaire. La boucle 1 se trouve entre les brins β B et β C, la boucle 2 entre les brins β E et β F et la boucle 3 entre les brins β G et β H.

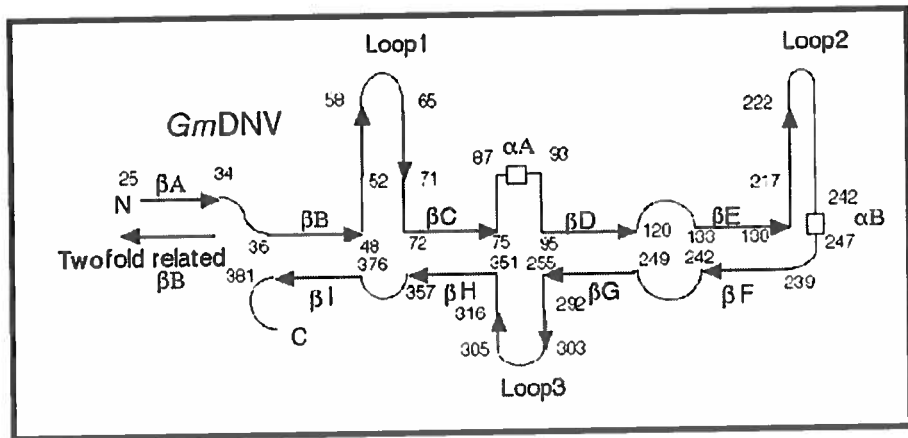


TABLEAU I : Positions des C-alphas dans la pointe des boucles et à l'extrémité C-terminal

Boucle	Acide aminé	x	Y	z
Boucle 1	60-Thr	33.725	-28.139	118.987
	61-Gly	32.398	-30.416	121.782
	62-Thr	29.942	-32.681	122.465
	63-Thr	30.882	-33.638	118.864
	64-Ala	34.603	-34.217	118.103
Boucle 2a	173-Thr	27.647	-11.953	125.006
	174-Gly	29.778	-13.439	127.836
	175-Asp	29.905	-9.854	129.212
	176-Thr	30.656	-8.575	124.945
	177-Gly	31.670	-10.507	121.783
Boucle 2b	190-Ser	19.983	7.231	121.687
	191-Thr	21.049	6.342	125.269
	192-Asn	22.856	2.971	125.636
	193-Asp	26.637	3.213	126.270
	194-Thr	28.894	1.460	123.702
	195-Ala	26.176	3.437	121.842
Boucle 3a	275-Thr	-18.283	-21.535	115.408
	276-Val	-20.018	-19.611	118.245
	277-Lys	-22.141	-21.913	120.471
	278-Gly	-18.527	-23.055	121.098
	279-Thr	-16.235	-26.081	121.690
	280-Ile	-15.252	-28.583	118.558
	281-Ser	-15.798	-28.516	114.755
Boucle 3b	320-Phe	6.143	-15.536	115.017
	321-Asn	7.833	-14.260	118.222
	322-Ile	8.640	-12.249	121.395
	323-Tyr	12.268	-11.074	121.865
	324-Ser	11.087	-7.910	120.032
	325-Asp	14.697	-8.226	118.757
	326-Ile	13.844	-11.806	117.653
Extrémité C	430-Asn	15.999	-28.052	106.967
	431-Gly	17.481	-30.222	115.438
	432-Ala	20.243	-28.275	117.266
	433-Thr	23.126	-25.872	118.086
	434-Leu	25.918	-27.848	115.791
	435-Gly	21.627	-28.961	105.858
	436-Asn	19.289	-31.149	103.735
	437-Val	16.399	-32.590	101.656

x est la distance à partir de l'axe 2 en direction de l'axe 5 (en angstroms).

y est la distance à partir de l'axe 2 en direction de la gauche de l'axe 3.

z est la distance à partir du centre du virion. Source : NCBI AAA66967

Donc, plus la valeur de z est élevée, plus le C-alpha est loin du centre du virion et exposé à sa surface.

interactions des axes 2, 3 et 5, qui cachent 10%, 20% et 15% de la surface du monomère, respectivement. L'extrémité amino-terminal du brin β A participe à la plupart des contacts générés par les axes 2 (figure 5a) (Simpson *et al.*, 1998). Les contacts générés par les axes 3 impliquent principalement la boucle 3 et les séquences qui l'encadrent (résidus 270-319) qui forment un feuillet β à 4 brins inter sous-unitaires autour de l'anneau β . Il y a donc une structure d'anneau β antiparallèle autour d'une dépression à l'axe 3 (figure 5b et 7) (Simpson *et al.*, 1998). À basse résolution en microscopie cryoélectronique (résolution 0,2 nm) on retrouve des pointes plates triangulaires dans le centre de l'axe rotationnel 3 (figure 3), mais les analyses par cristallographie en rayon X indiquent une dépression avec un petit cylindre au centre de l'axe 3 (figure 7) (Bergoin et Tijssen, 1998).

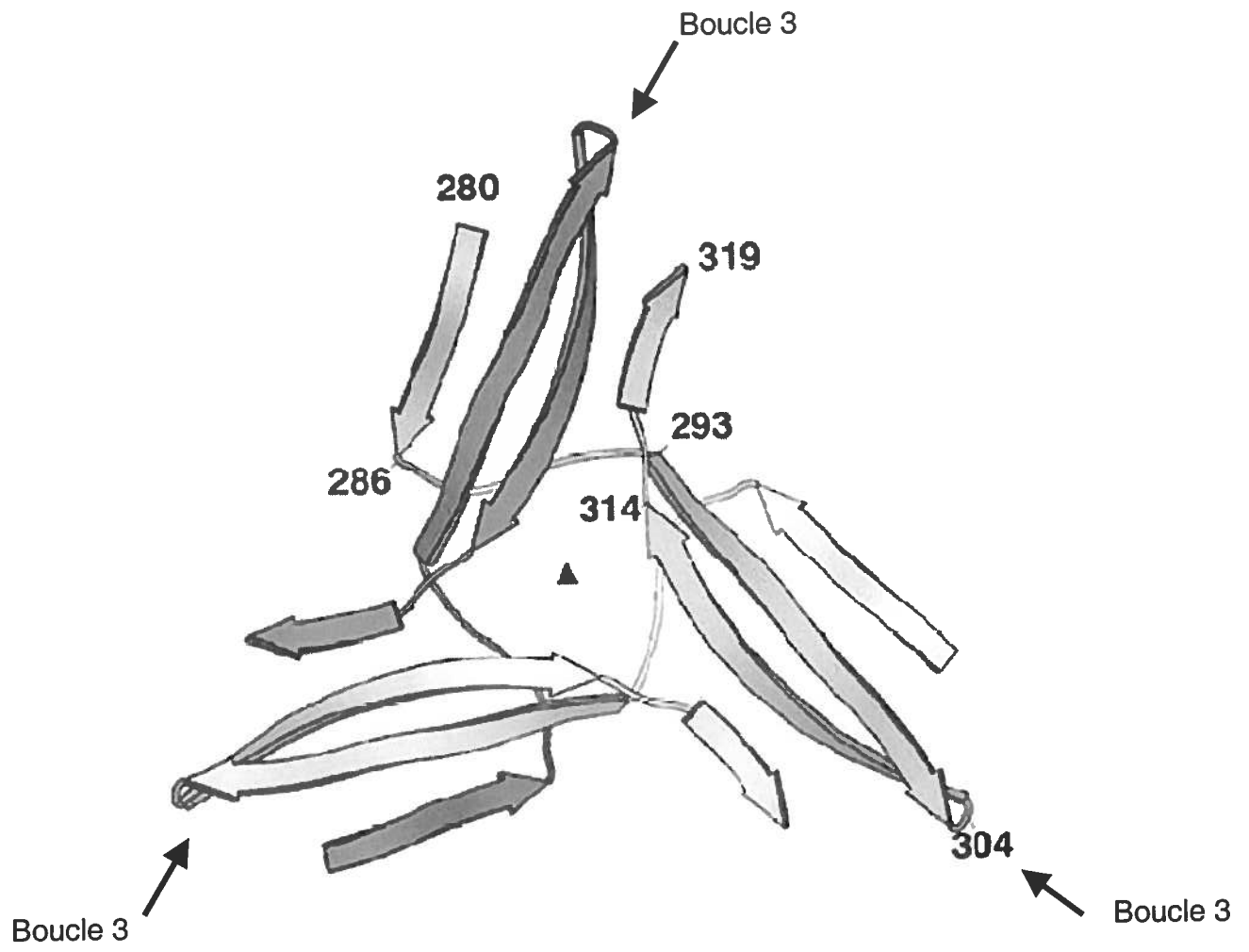
Les contacts qui sont générés à l'axe 5 sont moins intenses que les contacts aux axes 2 et 3 (Simpson *et al.*, 1998). À l'axe 5, on retrouve un tunnel entouré d'une tourelle ressemblant à une rosette plate (figure 5c). Les extensions amino-terminales de VP1, VP2 et VP3 (le C-terminal de ceux-ci étant identique à VP4) peuvent se projeter vers l'extérieur à partir de ce tunnel. Il faut noter que les DNVs partagent avec les parvovirus de vertébrés un domaine riche en petits acides aminés (e.g. glycines). Environ 10 à 20 résidus en aval de l'extrémité amino-terminal de VP4, on retrouve un motif riche en glycine qui permettra l'utilisation de ce tunnel par chacune des quatre VPs pour externaliser l'extrémité amino-terminal des sous-unités. Par contre, le diamètre du tunnel ($\sim 9 \text{ \AA}$), dicte que la plupart des 5 extensions N-terminal à chacun des tunnels vont rester à l'intérieur de la capsid, car il y a de la place pour seulement une extension, probablement celle de VP1 (Simpson *et al.*, 1998; Bergoin et Tijssen, 1998). Comme la cristallographie en rayon X ne donne pas d'informations structurales sur les 10 acides aminés N-terminal de VP4 et sur les extensions N-terminal de VP-1, -2 et -3, il est possible que ces terminaisons N-terminal forment des structures additionnelles à la surface (Bergoin et Tijssen, 1998).

8. PARTICULES VIRALES RECOMBINANTES VIDES (VLPs)

Au cours de la dernière décennie, les baculovirus ont retenu l'attention pour leur capacité d'exprimer de grandes quantités de protéines qui miment les protéines virales authentiques, non seulement dans leurs séquences primaires en acides aminés, mais aussi dans leur structure tri-

FIGURE 7 : Anneau β autour de l'axe rotationnel 3.

Les contacts générés par les axes 3 impliquent principalement la boucle 3 et les séquences qui l'encadrent qui forment un feuillet β à 4 brins inter sous-unitaires autour de l'anneau β .



dimensionnelle. Les protéines recombinantes sont dans plusieurs cas antigéniquement, immunogéniquement et fonctionnellement similaires à leur contrepartie authentique (Luckow et Summers, 1988). Le système d'expression du baculovirus permet une production de protéines à grande échelle basée sur la réplication du baculovirus recombinant dérivé du virus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (*AcNPV*) dans les cultures de cellules d'insectes. Pour obtenir un baculovirus recombinant, il y a quatre grandes étapes, (a) préparation du gène codant pour la protéine qu'on veut exprimer, (b) insertion du gène dans un vecteur de transfert de baculovirus, (c) transfection de cellules hôtes permissives avec le vecteur de transfert du baculovirus contenant le gène d'intérêt, et (d) sélection du baculovirus recombinant exprimant la protéine voulue (Luckow et al., 1993).

Les baculovirus recombinants ont été utilisés avec succès pour exprimer des protéines de capsides virales ayant l'habileté de former des particules virales recombinantes vides qu'on appelle VLPs pour "virus-like particules". Entre autre, ils ont été utilisés pour produire des VLPs de rotavirus (Sabara et al., 1991), de picornavirus (Urakawa et al., 1989), d'orbivirus (French et al., 1990), de calicivirus (Plana-Duran et al., 1996), de papillomavirus (Rose et al., 1993; Müller et al., 1997) et enfin, des VLPs de parvovirus (Brown et al., 1991; Kajigaya et al., 1991; Lopez de Turiso et al., 1992; Martinez et al., 1992; Saliki et al., 1992; Christensen et al., 1994; Le Gall-Reculé et al., 1996; Tijssen, RÉSULTATS NON PUBLIÉS). L'assemblage de ces particules permet non seulement une étude de la morphogenèse virale, mais ces structures peuvent aussi servir de nouveaux vaccins. Ces vaccins offriront comme avantages, entre autres, (i) l'élimination des réservoirs viraux utilisés dans la préparation des vaccins conventionnels, (ii) la prévention d'une éventuelle épidémie due à une évasion virale pendant la production de vaccins, et (iii) la facilitation de l'éradication des maladies virales. Les VLPs sont exprimées à de haut niveau et sont facilement purifiées sur un gradient de CsCl. Elles sont hautement immunogènes dans leur hôte correspondant, sont complètement protectrices à des doses aussi basses que 1-2 µg de matériel purifié par animal et aucun adjuvant spécial n'est requis (Casal, 1999).

Les VLPs peuvent également servir de plates-formes ou de molécules porteuses pour la présentation d'épitope. En effet, on peut insérer un épitope, ou peptide, d'un autre virus sur la

VLPs pour s'en servir comme système de livraison d'antigène. Ce système a été utilisé à plusieurs reprises avec, entre autres, le virus de l'hépatite B produit dans des bactéries (Clarke, *et al.*, 1990), le rotavirus produit dans le baculovirus (Tosser *et al.*, 1992) et quelques parvovirus (Brown *et al.*, 1994 ; Miyamura *et al.*, 1994; Sedlik *et al.*, 1995, 1997; Lo-Man *et al.*, 1998; Sedlik *et al.*, 1999). Dans tous les cas, il y avait induction d'une réponse immunitaire spécifique à l'épitope présenté. Pour insérer des épitopes, il faut identifier les domaines de la protéine virale (VP) qui peuvent être manipulés sans altérer la formation des capsides. Il faut aussi s'assurer de la présentation correcte des épitopes sur la surface de la capside. Pour identifier ces régions, on devrait se baser sur deux aspects majeurs, la structure tri-dimensionnelle du virion et les études d'immunogénicité (Sedlik *et al.*, 1995).

L'endroit où l'on positionne les épitopes dans la capside dépend de la réponse immunitaire que l'on veut stimuler. Par exemple, les épitopes B devraient être placés à la surface de la capside pour stimuler l'immunité humorale contre l'épitope inséré, tandis que les épitopes T capable de stimuler les cellules T CD4+ ou CD8+ devraient être localisés à l'intérieur de la capside pour stimuler l'immunité cellulaire (Casal, 1999). Ceci a été démontré pour la première fois en 1995 par Sedlik, *et al.*, qui avaient choisi un épitope T (CD4⁺) du poliovirus, C3 :T, pour l'insérer en N-terminal des VLPs du parvovirus porcine (Martinez *et al.*, 1992), qui se trouve à l'intérieur de la capside. Les particules ont provoqué une réponse T auxiliaire dans les souris. Par contre, un autre épitope de type B, C3, inséré au même endroit dans ces capsides ne provoquait pas de réponse humorale. Les auteurs ont donc placé, ce même épitope (C3 :B) dans la boucle 2 des VLPs du parvovirus canin (Lopez de Turiso *et al.*, 1992 ; Saliki *et al.*, 1992) qui se trouve à l'extérieur de la capside et les souris ont développé une forte réponse en anticorps neutralisant poliovirus (Sedlik *et al.*, 1995). En 1997, Sedlik *et al.* ont répété l'expérience en mettant un épitope de type T CD8⁺ venant de la nucléocapside du virus LCMV (lymphocytic choriomeningitis) en N-terminal de la VP2 du PPV et ces particules étaient capables de provoquer une réponse des lymphocytes T cytotoxiques et de protéger les souris contre une infection létale avec le LCMV (Sedlik *et al.*, 1997). Donc, le N-terminal peut être utilisé pour présenter des épitopes T (CD4⁺ et CD8⁺)correctement, donnant une stratégie sécuritaire et efficace pour induire des réponses T auxiliaires et cytotoxiques, et pour stimuler l'immunité

antivirale. Les parties de la capsidie qui sont exprimées à l'extérieur, telle que les boucles, peuvent accommoder des épitopes de type B à la surface de la capsidie induisant une forte réponse immunitaire humorale contre l'épitope inséré.

Les résultats exposés précédemment montrent que des particules de parvovirus non-répliquatives portant un polypeptide inséré sont structurellement stables et hautement immunogéniques. Ces résultats offrent donc la possibilité de combiner des épitopes de type B et T dans une même particule chimérique, ouvrant la porte au développement de vaccin hautement efficace contre un ou plusieurs pathogènes en utilisant une combinaison de différents types d'épitopes (B, CD4⁺ et CD8⁺) dans différentes positions sur la VLP (Casal, 1999).

L'idée de placer des épitopes sur des capsides de parvovirus se base sur les travaux de Bachmann et Zinkernagel (1996) qui ont démontré qu'il y avait une corrélation entre le degré de répétition de l'épitope et l'efficacité de la réponse immunitaire. Ceux-ci se sont basés sur le fait que l'organisation de l'antigène dans une forme multimérique régulière d'une grandeur appropriée est cruciale pour la reconnaissance par les cellules immunitaires. Les parvovirus ont une structure icosaédrale qui exhibe une surface d'antigènes hautement organisée, ce qui en fait un bon candidat comme plate-forme pour présenter des antigènes (Bachmann *et al.*, 1993; Bachmann *et al.*, 1995; Bachmann et Zinkernagel, 1996).

Le *GmDNV*, un parvovirus d'insecte, offre aussi la possibilité de former des VLPs en exprimant ces protéines virales (VP) dans le système d'expression du baculovirus. L'épitope de protection du virus respiratoire syncytial humain offre un bon modèle pour évaluer la possibilité qu'offre le *GmDNV* à présenter des épitopes. En effet, les acides aminés essentiels constituant cet épitope, le repliement via les ponts disulfures, ainsi que son activité biologique sont relativement bien caractérisés, facilitant ainsi l'analyse de l'efficacité des capsides vides du *GmDNV* pour la présentation d'antigènes. De plus, il existe un modèle murin permettant de tester l'efficacité du vaccin recombinant. Étant donné les besoins urgents d'un vaccin pour la prévention de l'infection par le VRSH, il est important d'étudier la possibilité offerte par le *GmDNV* pour la production d'un vaccin efficace et sécuritaire.

9. LE VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL HUMAIN (VRSH)

Le virus respiratoire syncytial humain (VRSH) a été isolé pour la première fois en 1956 à partir d'un chimpanzé symptomatique de laboratoire durant une épidémie d'une maladie ressemblant à un rhume commun (Morris *et al.*, 1956). Peu de temps après, un virus semblable a été isolé chez des enfants dans plusieurs coins du monde et les chercheurs ont conclu que le VRSH était associé à une maladie des voies respiratoires inférieures. Il a été rapidement déterminé que le VRSH était une cause majeure et répandue des maladies des voies respiratoires inférieures durant l'enfance et la petite enfance (Glezen *et al.*, 1973). Plus tard, il a été établi que le VRSH était un agent important de maladie chez les adultes immunosupprimés et les personnes âgées (Hertz *et al.*, 1989; Falsey *et al.*, 1990). La pathogenèse du VRSH serait due à la réponse immunitaire (réponse exagérée des cellules T cytotoxiques) de même qu'aux propriétés cytopathogènes du virus. Une partie des dommages cellulaires sont causés par la fusion des cellules infectées avec les cellules avoisinantes.

Le VRSH est l'agent causal le plus important des maladies virales des voies respiratoires inférieures chez les nouveau-né (es) et chez les enfants en bas âge. Les principales pathologies rencontrées chez les jeunes enfants infectés par le VRSH sont la bronchite, la bronchiolite et la pneumonie (Kim *et al.*, 1973a). Les enfants âgés de un à quatre mois sont les plus touchés par les pathologies graves (Everard et Milner, 1992). Par contre, chez les adultes, l'infection se manifeste comme un simple rhume. Environ 50% des enfants sont infectés la première année de leur existence et 50% la seconde (Kim *et al.*, 1973a). Au Canada, le taux de mortalité chez les enfants hospitalisés suite à une infection avec le VRSH est estimé à près de 1% (Navas *et al.*, 1992). Malheureusement, jusqu'à ce jour aucun vaccin approuvé ou de thérapie anti-virale hautement efficace pour les infections au VRSH ne sont disponibles (Collins *et al.*, 1996).

9.1 Généralités

Le VRSH est un membre de l'ordre des *Mononegavirales*, qui est constitué de virus à ARN à polarité négative non-segmenté. Il appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, à la sous-famille des *Pneumovirinae* et au genre *Pneumovirus*. Son génome est constitué d'ARN linéaire monocaténaire à polarité négative. Le génome est associé à des protéines virales pour former une

nucléocapside. Le VRSH acquiert une bicouche d'enveloppe lipidique contenant les glycoprotéines transmembranaires de surface codées par le virus lorsque la nucléocapside bourgeonne à la membrane plasmique de la cellule infectée. Les glycoprotéines virales servent à l'attachement et à la pénétration et sont organisées séparément en spicules sur le virion. Ces spicules peuvent être visualisés en microscopie électronique comme étant de courtes projections (11 à 20 nm) de surface distribuées à intervalles de 6-10 nm (figure 8a). Le génome code pour 10 protéines parmi lesquelles 3 se retrouvent sur la membrane du virion, ce sont les protéines transmembranaires de surface F,G et SH (Collins *et al.*, 1996) dont F et G sont les antigènes viraux majeurs pour l'induction d'une immunité protectrice (Olmsted *et al.*, 1986; Stott *et al.*, 1986; Walsh *et al.*, 1984, 1987). Des anticorps dirigés contre les protéines F ou G neutralisent l'infectivité du virus et semblent jouer un rôle majeur dans l'immunité protectrice contre le VRSH (Hall *et al.*, 1991).

9.2 Les glycoprotéines de surface du VRS

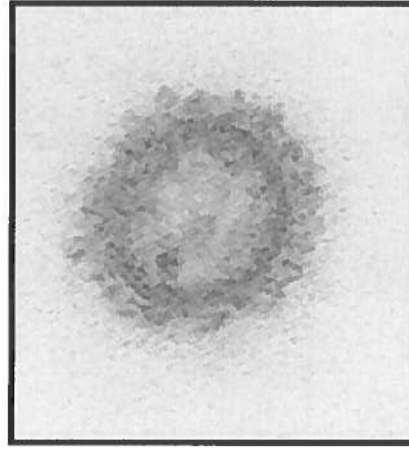
9.2.1 La glycoprotéine F

La glycoprotéine F est responsable de la fusion de l'enveloppe virale du VRSH à la membrane cellulaire de la cellule hôte, donc de l'entrée du virus dans la cellule et de la formation de syncytium. L'identification directe de la glycoprotéine F du VRSH a été faite en découvrant que certains anticorps monoclonaux spécifiques à F inhibaient la formation de syncytium dans les cultures de tissus (Walsh et Hruska, 1983). La découverte que l'expression de la protéine F par un virus SV40 recombinant entraînait la formation de syncytium en culture de tissus a servi à confirmer ce rôle (résultats non publiés). La glycoprotéine F est de type I typique, contenant une séquence signal amino-terminal clivée et un ancrage transmembranaire près de l'extrémité carboxy-terminal (Collins *et al.*, 1996). Cette glycoprotéine est codée par un ARNm de 1899 nucléotides et donne une protéine de 574 acides aminés avec une masse moléculaire de 63 453 Da. Sa séquence a été déterminée par Collins *et al.* en 1984.

FIGURE 8 : Représentation des spicules sur le VRSH ainsi que de sa glycoprotéine G.

A. Les glycoprotéines virales sont organisées séparément en spicules de 11 à 20 nm à la surface du virion et elles sont rapprochées (6 à 10 nm d'intervalle). **B.** La glycoprotéine G est de type II avec extrémité carboxy-terminal extracellulaire, avec un seul domaine hydrophobe situé entre les résidus 38 à 66. La région 173-187, comprend 4 résidus cystéine qui forment des ponts disulfures intrapeptidiques et qui font une boucle importante pour l'antigénécité du peptide.

A.

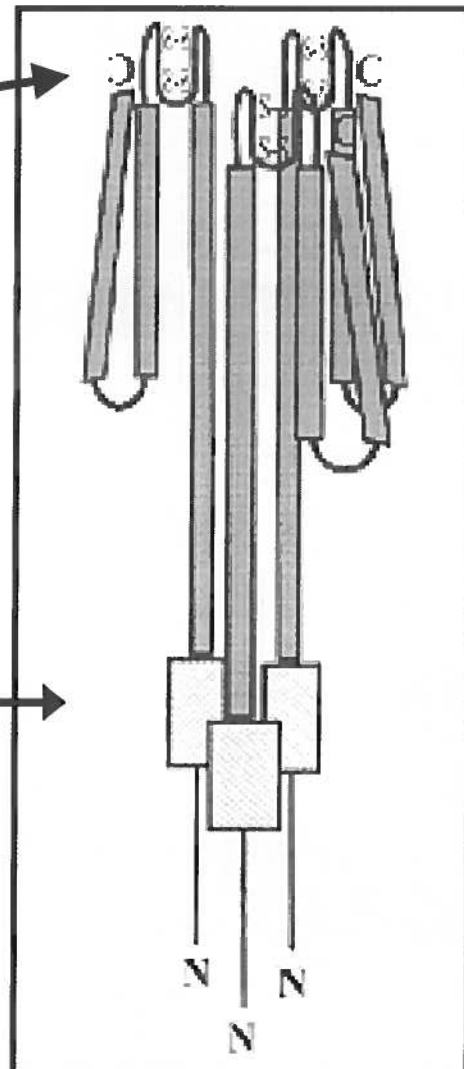


B.

Région 173-187 (boucle)

- 4 résidus cystéines (173,176,182,186)
- Ponts disulfures

Domaines hydrophobes



9.2.2 La glycoprotéine G

La glycoprotéine G est responsable de l'attachement du virus à son récepteur cellulaire. Cette protéine a été identifiée comme protéine d'attachement viral par la découverte que des anticorps spécifiques à cette protéine, mais non ceux qui reconnaissent la protéine F, inhibaient l'adsorption des virions aux cellules (Levine *et al.*, 1987). Cette protéine est une glycoprotéine de type II d'environ 289-299 acides aminés (selon la souche virale) avec un domaine hydrophobe signal/ancrage non-clivé situé entre les résidus 38 à 66 qui sert de peptide signal et d'ancrage transmembranaire près de l'extrémité amino-terminal donc ayant une extrémité C-terminale extracellulaire (figure 8b) (Melero *et al.*, 1997). La glycoprotéine G est codée par un ARNm de 918 nucléotides contenant un seul cadre de lecture ouvert qui code pour un polypeptide d'en moyenne 298 acides aminés avec une masse moléculaire de 32 587 Da. Par contre, la masse moléculaire de la glycoprotéine mature est d'environ 90 000 Da ce qui suggère que plus de la moitié de sa masse moléculaire est apportée par les glycosylations (Wertz *et al.*, 1985). La séquence en acides aminés de la glycoprotéine G a été déterminée par Johnson *et al.* en 1987(a). Dans son domaine extracellulaire, la glycoprotéine G possède une région de 13 acides aminés (164-176) conservée parmi toutes les souches humaines ce qui en fait une candidate pour être impliquée dans la liaison du récepteur. Ce domaine conservé précède quatre résidus cystéines conservés et rapprochés exactement aux positions 173, 176, 182 et 186. Ces résidus coïncident avec une boucle dans la structure secondaire prédite, une boucle liée par des ponts disulfures. Les ponts disulfures se font entre les différentes cystéines constituant le motif structural appelé 'lacet de cystéine'; ce modèle permet d'expliquer structurellement la localisation de sites antigéniques importants (figure 8b) (Langedijk *et al.*, 1996). L'efficacité antigénique du peptide dépendrait donc de la formation d'une structure en forme de boucle qui serait stabilisée par des ponts disulfures intrapeptidiques entre les résidus Cys176-Cys182 et Cys173-Cys186 (Akerlind-Stopner *et al.*, 1990; Simard *et al.*, 1997). Afin de déterminer les sites antigéniques de la glycoprotéine G, Olmsted *et al.* (1989) ont utilisé des mutants du virus de la vaccine recombinant tronqués en C-terminal pour montrer que la protection était conservée chez le mutant tronqué après les 230 premiers acides aminés (mutant 230), alors que la protection était perdue chez les mutants tronqués après les 71 premiers a.a. (mutant 71) et les 180 premier a.a. (mutant 180) indiquant donc que la région entre 180 et 230 était critique pour induire la protection. En 1995, Simard *et al.* avait comme hypothèse que l'inactivité du mutant 180 était due à l'interruption de la région

174-187. Donc, ils ont examiné l'activité de protection de la région 124-203 de la glycoprotéine G l'exprimant comme une protéine de fusion dans un virus de la vaccine recombinant. Les souris ont produit des anticorps spécifiques et leur effet protecteur était significatif puisqu'ils enrayaient la réplication du VRSH dans les poumons des animaux lors d'une épreuve virale. Les résultats de ces auteurs suggéraient que les résidus 124 à 203 de la glycoprotéine G contenaient la majeure partie du domaine impliqué dans la protection. Il a été démontré que la glycoprotéine G était un épitope protecteur, mais non-neutralisant (Anderson *et al.*, 1986).

La glycoprotéine G du VRSH a été exprimée dans des cellules d'insectes par un baculovirus recombinant. Cette protéine possédait des propriétés immunogéniques similaires à celles de la glycoprotéine G exprimée dans les cellules de mammifères. Donc, l'expression de la glycoprotéine G dans le baculovirus est utile pour l'étude de la réponse immunitaire contre le VRSH, malgré une petite différence de glycosylation (Sullender *et al.*, 1996).

Il existe 2 sous-groupes antigéniques du VRSH: le sous-groupe A (souche Long) et le sous-groupe B (souche 18537) (Mufson *et al.*, 1985). Ce dimorphisme antigénique est attribué principalement à des variations dans la glycoprotéine G. Les sous-groupes des souches A et B semblent être reliés antigéniquement à 25% en général, 50% avec la protéine F et 1% à 7% avec la protéine G (Johnson *et al.*, 1987b). Il a été démontré que le site antigénique spécifique de sous-groupe est localisé dans la région 174-188 d'acides aminés de la glycoprotéine G (Akerlind-Stopner *et al.*, 1990).

9.3 Immunité

Chez l'hôte naturel, l'immunité induite par le VRSH est partiellement efficace puisqu'un individu peut être ré-infecté tout au long de sa vie. Un certain niveau de protection semble être apporté par l'immunité humorale, alors que l'élimination de l'infection impliquerait plus particulièrement l'immunité à médiation cellulaire.

9.3.1 Immunité à médiation cellulaire

La guérison est probablement due aux lymphocytes T car il y a une réponse de prolifération des cellules T suite à l'infection. Chez les enfants normaux, la réplication du virus cesse 1 à 3 semaines après l'infection tandis que les sujets souffrant de déficits immunitaires affectant les lymphocytes T CD8⁺ sont incapables de mettre fin à l'infection et le virus continue à être excrété pendant plusieurs mois (Fishaut *et al.*, 1980). De plus, un transfert passif de cellules T stimulées peut éliminer l'infection. Par contre, des études chez la souris ont mis en évidence que des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques au VRSH pouvaient jouer un rôle dans la pathogenèse de la maladie du VRSH. Ces cellules accélèrent l'élimination du virus VRSH des poumons, mais l'élimination est accompagnée par des maladies pulmonaires aiguës parfois fatales (Cannon *et al.*, 1988).

9.3.2 Immunité humorale

Un haut titre en anticorps circulant a été associé à la protection chez les enfants, quoique, la protection semble davantage être en corrélation avec les niveaux d'anticorps de type IgA. Un transfert d'anticorps passif contre les protéines F et G diminue la réplication du virus dans les poumons de souris (Taylor *et al.*, 1984) et les rats de coton (Walsh *et al.*, 1984). Les travaux de Hall *et al.* (1991) suggèrent que l'immunité humorale contre les protéines F et G est en corrélation avec une résistance contre la ré-infection, mais la protection est loin d'être complète et elle est de courte durée. Les anticorps sériques protègent les poumons de l'infection, mais ont peu d'effet sur la réplication au niveau du système respiratoire supérieur. Donc, les voies respiratoires supérieures seraient protégées principalement par l'immunité locale.

10. LES VACCINS

Malgré les sérieuses implications cliniques et économiques des infections au VRSH, il n'y a actuellement pas de vaccin sécuritaire et efficace contre ce pathogène. Les seuls traitements utilisés aujourd'hui contre le VRSH sont les antiviraux (Ribavirine) et les immunoglobulines spécifiques au VRSH (RespiGam). Malheureusement, ces thérapies sont particulièrement coûteuses et ne sont administrées qu'aux enfants à risque élevé dans les milieux favorisés. La Ribavirine, qui inhibe la synthèse des protéines virales, est administrée sous forme d'aérosol

pendant 12 à 18 heures et le coût est de 3000\$ U.S. par cinq jours. Outre le coût élevé du traitement, on note seulement une légère tendance vers une guérison plus rapide chez les patients qui le reçoivent (Collins *et al.*, 1996). C'est pourquoi il est impératif de développer un vaccin efficace et sécuritaire contre le VRSH.

10.1 Vaccin inactivé

Au milieu des années 1960, Kapikian *et al.* (1969) ont fait des essais de vaccins inactivés à la formaline chez des enfants. Le vaccin ne protégeait pas les enfants contre de prochaines infections avec le VRSH malgré l'induction d'un niveau modéré d'anticorps neutralisants dans le sérum et de plus, les enfants ont développé des maladies exacerbées des voies respiratoires inférieures après une infection naturelle subséquente (Kim *et al.*, 1969). Les pathologies aggravées associées au vaccin inactivé à la formaline seraient probablement reliées à une mauvaise réponse immunitaire en produisant des anticorps contre des épitopes non protecteurs capables de former des complexes immuns conduisant à une pathologie immune (réaction d'Arthus pulmonaire) (Murphy *et al.*, 1986; 1988). Probablement que la modification des épitopes sélectionnés sur les glycoprotéines de fusion (F) et d'attachement (G) seraient en cause (Murphy *et al.*, 1986; Prince *et al.*, 1986). L'expérience a été reproduite chez des rats de coton et un mois après la vaccination, une épreuve virale a entraîné une inflammation pulmonaire sévère caractérisée par une infiltration de cellules mononucléaires et polymorphonucléaires affectant 30 à 40% des poumons (Wathen *et al.*, 1991).

10.2 Vaccin atténué

Des essais d'immunisation avec des mutants thermosensibles ont conduit à des pathologies respiratoires graves chez les enfants, car la souche n'était pas suffisamment atténuée (Kim *et al.*, 1971, 1973b). Ces vaccins étaient instables génétiquement et perdaient leur caractère thermosensible (Hodes *et al.*, 1974; Anderson et Heilman, 1995). Chez les adultes, une immunisation avec un triple mutant thermosensible qui était plus stable génétiquement a donné des pathologies respiratoires mais une diminution plus forte du titre de virus sauvage (Pringle *et al.*, 1993).

10.3 Vaccin peptidique (sous-unitaire)

Les glycoprotéines de surface G et F ont été les principales cibles pour l'élaboration de vaccins sous-unitaires contre le VRSH. La plupart des études chez les rongeurs ont montré que les protéines G et F étaient très immunogènes et avaient un très bon potentiel protecteur. En effet, l'immunisation avec un virus recombinant de la vaccine exprimant les glycoprotéines F ou G, montre que celles-ci F et G sont des antigènes viraux majeurs qui protègent contre l'infection lors d'une épreuve virale (Elango *et al.*, 1986; Olmsted *et al.*, 1986; Stott *et al.*, 1986, 1987; Sullender *et al.*, 1990; Simard *et al.*, 1995). Par contre, il a été noté que l'immunisation avec des vaccins recombinants de la vaccine portant l'épitope F ou G induisait une plus grande protection chez les souris que chez les rats de coton, donc l'hôte pourrait affecter l'immunité induite (Stott *et al.*, 1987). Lors d'essais de vaccination de souris avec le virus de la vaccine recombinant exprimant la glycoprotéine G, il a été remarqué que la plus grande variable affectant le niveau d'anticorps et la protection chez la souris est la voie de vaccination. La vaccination intranasale induit des taux d'anticorps 25 fois plus élevés dans les poumons par rapport à la voie intrapéritonéale. Malgré cette différence, lors de l'épreuve virale n'y avait pas de virus décelables dans les poumons des animaux vaccinés par l'une ou l'autre de ces voies (Stott *et al.*, 1987). Par contre, la vaccine n'est pas un vecteur souhaitable pour le développement d'un vaccin humain car il pourrait y avoir un renversement du phénotype et le virus pourrait redevenir virulent.

Un autre type de vaccin peptidique a été expérimenté au début des années 1990. L'équipe de Trudel a effectué des immunisations de souris Balb/c avec un peptide de synthèse représentant la région 174-187 de la glycoprotéine G du VRSH. Les peptides étaient capables de protéger les souris contre l'infection suite à une épreuve virale intranasale avec le virus vivant. C'était la première fois qu'un peptide synthétique induisait une protection contre une infection par le VRSH (Trudel *et al.*, 1991). Suite à l'utilisation de ce peptide de synthèse correspondant à la région 174-187 contenant différentes combinaisons de résidus cystéines (173, 176, 182 et 186), il a été démontré que l'efficacité des peptides dépendait de la formation d'une structure en forme de boucle qui serait stabilisée par des ponts disulfures intrapeptidiques entre les résidus Cys176-Cys182 et Cys173-Cys186. Si les groupes sulfidryles du peptide synthétique étaient bloqués chimiquement, l'activité de protection était complètement éliminée (Simard *et al.*, 1997). Pour

augmenter l'efficacité du peptide synthétique, les auteurs ont conclu que le peptide devait être couplé à une macromolécule ou un virus inoffensif, pour induire une immunité plus efficace.

Pendant cette période, un autre groupe de chercheurs a procédé à l'immunisation de rats de coton avec une glycoprotéine chimérique FG qui avait été exprimée dans des cellules d'insectes en utilisant un vecteur de baculovirus. Cette glycoprotéine chimérique FG avait induit une inflammation minimale des poumons (2 à 5%) et les rats étaient protégés contre l'épreuve virale. Donc, la glycoprotéine chimérique FG était hautement immunogénique et induisait une inflammation pulmonaire minimale chez les rats de coton (Wathen *et al.*, 1991). La glycoprotéine G seule a aussi été exprimée chez les baculovirus et a aussi induit une protection chez les rats de coton (Sullender *et al.*, 1996). La glycoprotéine F purifiée à partir de cellules Vero a aussi été utilisée comme vaccin pour des enfants hospitalisés suite à une infection au VRSH; aucun enfant ayant reçu le vaccin n'a été ré-infecté par le VRSH 6 mois après la vaccination. Il n'y avait pas d'effet secondaire significatif et aucune aggravation des maladies respiratoires n'a été notée indiquant que la glycoprotéine F pouvait prévenir l'infection chez des enfants en santé qui avaient déjà eu une infection du VRSH (Tristram *et al.*, 1993).

Des adénovirus recombinants exprimant la glycoprotéine de fusion F, la glycoprotéine d'attachement G, ou les deux protéines F et G du VRSH ont été testés chez des chiens et tous les vaccins recombinants ont complètement protégé les poumons contre une infection par le VRSH (Hsu *et al.*, 1992).

Une autre forme de vaccin expérimental qui a été utilisé est l'immunisation passive de souris avec des anticorps monoclonaux (18A2B2) non-neutralisants dirigés contre un épitope de la glycoprotéine G du VRSH souche Long du sous-groupe A. Ces anticorps ont conféré la protection aux souris contre une infection virale (Corbeil *et al.*, 1996).

Un autre vaccin sous-unitaire a été développé en utilisant les phages recombinants. Il a été démontré que l'immunisation de souris avec des phages recombinants présentant à leurs surfaces la région 173-187 de l'épitope de protection G provoquait une réponse immunitaire anti-

VRSH et donnait une protection complète des souris contre les infections VRSH en induisant un haut niveau d'anticorps circulants spécifiques au VRSH (Bastien *et al.*, 1997). L'utilisation des phages chez l'humain demeure cependant controversée due au danger que les phages transmettent des gènes de résistance aux bactéries constituant la flore bactérienne humaine.

Plus récemment, un autre vaccin a été développé: il s'agit de l'utilisation de la bactérie vivante *Staphylococcus carnosus* comme système vaccinal pour la livraison de la glycoprotéine G du VRSH. La région 171-188 avec les quatre résidus cystéine a été exposée à la surface de la bactérie. L'immunisation des souris avec le staphylococcus recombinant a provoqué la production d'anticorps et entraîné la protection des poumons après une épreuve virale ; ceci a été observé chez environ la moitié des souris (Cano *et al.*, 2000).

La région 174-187 de la protéine G est donc une candidate prometteuse pour l'élaboration d'un vaccin peptidique efficace et sécuritaire. Toutefois, il est nécessaire de développer un système qui permettra de produire cet épitope en grande quantité. Comme nous l'avons vu précédemment, les capsides recombinantes de densovirus présentant l'épitope G produit dans un système d'expression baculovirale pourraient offrir plusieurs avantages pour la production d'un tel peptide. Il faut d'abord faire en sorte que l'expression de la glycoprotéine G sur les capsides de densovirus soit optimale et que l'épitope soit bien présenté à la surface, pour étudier le potentiel immunogénique qu'offre ces capsides pour la présentation d'épitope. Les travaux présentés dans ce mémoire visent donc à étudier la faisabilité d'utiliser les capsides recombinantes de densovirus comme plate-forme pour présenter l'épitope protecteur de la région 174-187 de la protéine G du virus respiratoire syncytial humain.

MÉTHODOLOGIE

1. MÉTHODE DE CLONAGE

1.1 La réaction en chaîne en présence de polymérase (PCR)

1.1.1 Description du PCR

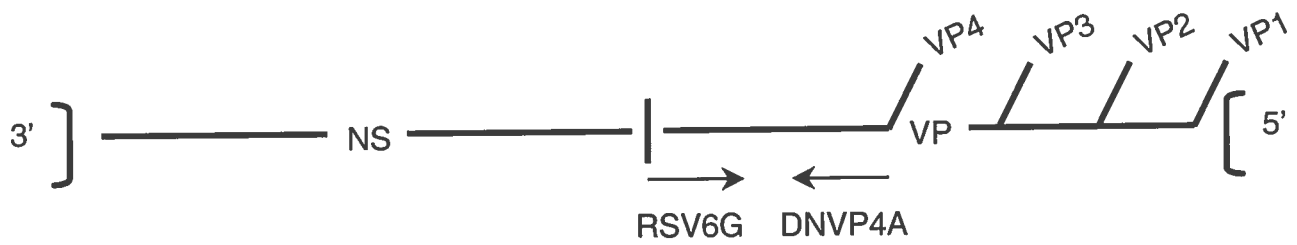
Le PCR permet d'amplifier un segment d'ADN dont on connaît la séquence de ses deux extrémités à partir d'une matrice. Le PCR se fait *in vitro* à l'aide d'une ADN polymérase thermorésistante, la *Taq* (*thermophilus aquaticus*). La matrice d'ADN est d'abord dénaturée par un réchauffement, en présence d'un excès de chacune des amorces et des quatre dNTP. La réaction est ensuite refroidie à une température qui permet aux amorces de s'accrocher à leur séquences cibles, ensuite chacune des amorces fait une élongation avec l'ADN polymérase. Les cycles de dénaturation, d'appariement et de synthèse d'ADN sont répétés plusieurs fois, chaque cycle doublant la quantité d'ADN (Mullis et Faloona, 1987; Mullis *et al.*, 1986).

1.1.2 Choix des amorces pour amplification de la VP4

Deux amorces (figure 9) ont été utilisées pour le PCR, DNVP4 et RSV6G. L'amorce DNVP4 a été synthétisée à partir de la séquence de l'extrémité 5' de la VP4 de *GmDENV*, le site de restriction *Bam*HI, non présent dans la région à amplifier de la séquence de *GmDENV*, a volontairement été incorporé à l'extrémité 5' de l'amorce afin de permettre le clonage du produit de PCR dans les sites de clonage multiple du vecteur utilisé. Ce site est accompagné d'un petit prolongement (GTG) qui facilite la coupure par l'enzyme de restriction *Bam*HI. L'amorce RSV6G a été synthétisée à partir de la séquence de l'extrémité 3' de la VP4 de *GmDENV*. Dans ce cas, la séquence de 6 glycines et le site de restriction *Xho*I (avec un prolongement CCG) ont été ajoutés à l'extrémité 5' de l'amorce, donc en 3' de la VP4. Cette queue flexible de glycine sert à éloigner l'épitope de la capsid en vue de minimiser les interactions de celui-ci avec la capsid, donc l'épitope sera plus accessible au système immunitaire et ne devrait pas interférer dans la formation des capsides. Les amorces utilisées ont été synthétisées dans le laboratoire du Dr. François Sharek de l'Institut Armand-Frappier.

FIGURE 9 : Amorces utilisées dans les réactions de PCR.

Les amorces DNVP4A et RSV6G ont été synthétisées à partir des séquences des extrémités 5' et 3', respectivement, de la VP4 de *GmDNV* et ont été utilisées lors de l'amplification par PCR. Leurs positions génomiques sont indiquées ainsi que la taille du fragment anticipé.



DNVP4A : 5' GTGGGATCCGCTATGTCATTACCAGGAACTGGC 3'
*Bam*HI

3980-4412

RSV6G : 5' CCGCTCGAGTCCACCACCTCCTCCACCTACATTACCCAAAGTTGCACC 3'
*Xho*I

3053-3110

1.359 Kb

1.1.3 Composante de la réaction

Dans un premier temps, 100 ng d'ADN viral du *GmDNV*, 0.5 μ L de 10 mM dNTP (Pharmacia : dATP (2'-Déoxyadénosine 5'- Triphosphate, cat. # 27-2052-01), dGTP (2'-Déoxyguanosine 5'- Triphosphate, cat. # 27-2072-01), dTTP (2'-Déoxythymidine 5'- Triphosphate, cat. # 27-2082-01), dCTP (2'-Déoxycytidine 5'-Triphosphate, cat. # 27-2062-01)), 10 μ L de tampon 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8.6), 500mM KCL, 1% Triton X-100), 10 μ L de $MgCl_2$ 20 mM et 1 μ L de chacune des amorces diluées à 59 pmol/ μ L ont été déposés dans un tube Eppendorf de 0.5 mL et le volume a été complété à 100 μ L avec de l' H_2O . Après le mélange, 2.5 unités de *Taq* (Pharmacia *Taq* DNA Polymérase) ont été ajoutés juste avant de commencer les cycles de PCR. La solution a été chauffée à 95 °C (dénaturation de l'ADN) pendant 1 minute, cette opération étant suivie par 35 cycles de 94 °C 30 secondes, 55 °C 30 secondes, 72 °C 1 minute, et enfin la réaction a été complétée par une élongation à 72 °C 6 minutes. Ces cycles ont été réalisés dans un appareil automatisé (Hybaid PCR, Touchdown). Les échantillons étaient conservés à 4 °C ou -20°C.

1.1.4 Analyse de l'ADN en gel d'agarose

Les échantillons d'ADN a été analysés par électrophorèse en gel d'agarose. Les gels d'agarose ont été préparés dans un tampon TAE (40 mM Tris acétate pH 7.8, 2 mM acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)) où le pourcentage d'agarose était de 1%. Les échantillons ont été appliqués sur gel en présence du tampon de chargement d'ADN (0.04% (p/v) bromophénol bleu, 0.04% (p/v) xylène cyanol FF, 5 % glycérol (v/v)). Le voltage a été ajusté à 100 volts. Le gel a ensuite été incubé dans un bain de bromure d'éthidium à raison de 0.5 μ g/mL. L'ADN fractionné a été visualisé par exposition du gel à une lumière ultra-violette (Trans-illuminateur, Fotodyne, Inc., WI 53151, USA). L'estimation de la taille des fragments a été faite par comparaison avec un marqueur d'ADN standard (1 Kb ladder, Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, On., Can.).

1.2 Clonage

1.2.1 Purification de l'ADN

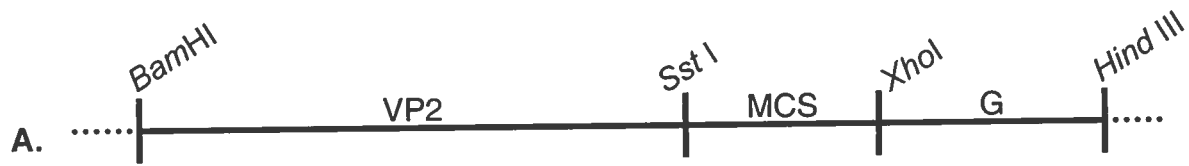
Entre les différentes étapes de clonage, l'ADN (vecteur et insert) a été purifié par un protocole de phénol/chloroforme. Pour ce qui est du vecteur issu de culture bactérienne, la trousse de Mini Preps de Quiagen a été utilisée. Le protocole de phénol/chloroforme consistait à mettre un volume de phénol/chloroforme égal à celui de l'échantillon à purifier et mélanger par inversion pendant trois minutes. L'échantillon était ensuite centrifugé à 8 000 RPM pendant 5 minutes et la phase aqueuse était transférée dans un nouveau tube (Eppendorf). Dans ce nouveau tube, un volume égal d'isopropanol était ajouté, le tube était mélangé par inversion trois fois et incubé deux minutes à la température de la pièce. Ensuite, le tube était centrifugé à 14 000 RPM pendant 15 minutes et le surnageant éliminé. Le culot était lavé avec 500 µL d'éthanol 70% et le tube re-centrifugé à la même vitesse trois minutes. L'éthanol était éliminé et le culot était séché à l'air libre pour ensuite être resuspendu dans 20 µL d'H₂O.

1.2.2 Vecteur

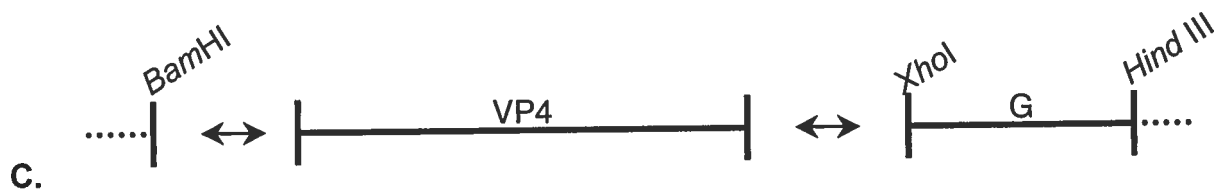
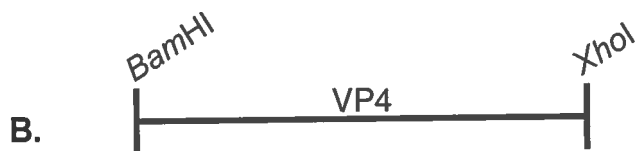
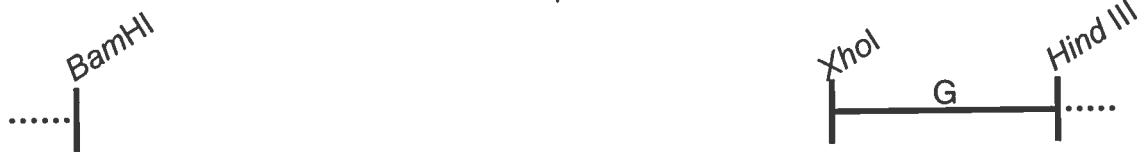
Dans ce projet, un seul vecteur a été utilisé, soit le vecteur pFastBac1. pFastBac1 est un plasmide donneur avec des sites de transposition. Il a 4775 paires de bases et contient les gènes de résistance à la gentamycine et l'ampicilline qui permettent d'utiliser ces antibiotiques comme facteurs de sélection en faveur des bactéries résistantes contenant le plasmide. Ce vecteur contient un site de clonage multiple ("multiple cloning site", positions: 3942-4171), qui contient, entre autres, les trois sites d'intérêt du projet où l'insert a été cloné: *Bam*HI (positions : 4032-4037), *Xho*I (positions: 4119-4124) et *Hind*III (positions: 4137-4142). pFastBac1 contient le promoteur fort de la polyhédrine du virus *AcNPV* (*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) sous le contrôle duquel on insert le gène qu'on veut exprimer, soit la séquence de la VP4 du *GmD*NV, le produit de PCR, suivi de l'épitope G du VRSH en C-Terminal, séparé par une queue de glycines. Dans ce projet, il faut spécifier que le vecteur de départ pFastBac1 utilisé contenait déjà la séquence de la VP2 de *GmD*NV clonée entre les sites *Bam*HI et *Sst*I, et contenait aussi la séquence de la glycoprotéine G (173-187) du VRSH insérée entre les sites *Xho*I et *Hind*III (figure 10 A). Ce clone n'a pu être utilisé car la séquence du site de clonage multiple du vecteur pFastBac1 était présente entre la VP2 et l'épitope, en plus des 6 glycines.

FIGURE 10 : Stratégie de clonage.

Il existait déjà un clone pFastBac1 contenant la séquence de VP2 de *GmDENV* clonée entre les sites *Bam*HI et *Sst*I et contenant aussi la séquence de la glycoprotéine G du VRSH insérée entre les sites *Xho*I et *Hind*III, ceux-ci étant séparés par le MCS. Ce clone a servi de vecteur de départ au clonage d'un nouveau clone contenant VP4. **A.** Il a donc fallu digérer le pFastBac1 de départ avec *Bam*HI et *Xho*I pour libérer la VP2 du vecteur. **B.** Le produit de PCR, VP4 + 6 glycines, à été digéré par les mêmes enzymes qui ont servi à enlever la VP2 du vecteur. **C.** Il y a eu une ligation du vecteur contenant toujours l'épitope G avec le produit de PCR digéré.



Digestion *Bam*HI-*Xho*I



1.2.3 Digestion

Le clone existant de pFastBac1 contenant la VP2 et l'épitope a d'abord été digéré avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Xho*I pour libérer la VP2 du vecteur et la remplacer par VP4 (figure 10 A). Dans un tube (Eppendorf) de 1.5 mL, les divers éléments étaient ajoutés et le volume complété à 80 μ L avec de l' H_2O : environ 2 μ g d'ADN, 8 μ L de tampon de digestion 10 X (Pharmacia Buffer H ; 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 100 mM NaCl), 2 μ L de chacune des enzymes de restriction *Bam*HI et *Xho*I (BRL ; 10 U/ μ L). Des témoins de digestion n'utilisant qu'une enzyme à la fois ont été préparés pour vérifier l'efficacité de chacune des enzymes

dans le tampon utilisé. Les tubes étaient alors agités légèrement et centrifugés 5 secondes. Ensuite, une incubation de 120 minutes à 37 °C fut réalisée. Après avoir vérifié sur gel d'agarose 1% que l'insert (VP2) était bel et bien sorti du vecteur, une deuxième digestion a été faite dans le même tube de digestion afin d'éliminer la VP2. Pour ce faire, un volume de 2 μ L de l'enzyme de restriction *Nco*I (BRL ; 10 U/ μ L) a été ajouté car cette enzyme coupe à l'intérieur de la séquence de la VP2 mais ne coupe pas dans le vecteur pFastBac1.

Pour ce qui est du produit de PCR (figure 10 B), la même réaction a été faite, mais cette fois dans un volume total de 70 μ L, soit 20 μ L du produit de PCR, 7 μ L de tampon de digestion 10 X, 2 μ L de chacune des enzymes de restriction *Bam*HI et *Xho*I et le reste d' H_2O . Cette digestion a été faite dans les mêmes conditions que celle du vecteur. Ensuite, les digestions du vecteur et du produit de PCR ont été suivies d'un phénol/chloroforme pour enlever les enzymes de la réaction et l'ADN a été resuspendu dans de l' H_2O . Les ADN ont été conservés à -20 °C.

1.2.4 Ligation

À cette étape, le fragment d'intérêt a été inséré dans le vecteur (figure 10 C). La proportion vecteur vs insert a été faite un peu à l'aveuglette (évaluation de la quantité sur gel d'agarose) même si elle aurait dû tenir compte de deux critères : 1) la proportion entre la taille du vecteur et celle de l'insert, 2) le rapport : 3 molécules d'insert pour 1 molécule de vecteur. Par exemple, dans un tube (Eppendorf) de 1.5 mL, 3 μ L de vecteur digéré (environ 150 ng), 6 μ L d'insert digéré (environ 300 ng), 4 μ L de tampon de ligation 5X (250 mM Tris-HCl (pH 7.6), 50

mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % (p/v) polyéthylène glycol-800) et 1 µL d'enzyme ligase (BRL ; T4 DNA ligase 1 U/µL) a été déposé, puis le volume complété à 20 µL avec de l'H₂O. Un témoin de ligation a été fait en remplaçant la quantité d'insert par de l'H₂O. Les solutions ont ensuite été légèrement agitées et centrifugées pendant 5 secondes. Les tubes ont été incubés à la température de la pièce pendant une heure avant la transformation.

1.3 Sélection des clones positifs

Afin de sélectionner des clones positifs, c'est-à-dire des plasmides contenant l'insert voulu, il faut d'abord transformer des bactéries compétentes avec le produit de ligation, faire pousser celles-ci et les analyser par digestion de UFX (ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction).

1.3.1 Transformation d'*Escherichia coli*

La souche bactérienne d'*Escherichia coli* utilisée pour la transformation était XL-1. L'électrocompétence de ces cellules a été réalisée par un affaiblissement de leurs parois cellulaires afin de faciliter l'introduction de l'ADN plasmidique à l'intérieur de celles-ci (procédure fournie par BTX, electronics genetics). Elles ont ensuite été conservées à -70 °C. Les cellules électrocompétentes étaient graduellement et lentement (car elles sont fragiles) décongelées sur glace fondante (0 °C). Des cuvettes à électroporation stériles (BTX Disposable "Universal" Cuvettes, 1 mm) ont également été placées sur la glace. Lorsque les cellules bactériennes (80 µL) ont été dégelées, 2 µL du produit de ligation (soit vecteur + insert ou vecteur seul comme témoin) leur ont été ajoutés. Ensuite, un volume de 40 µL de ce mélange a été déposé dans les cuvettes. Il était important de pipetter très délicatement les cellules compétentes à cause de leur grande fragilité. Les cuvettes ont ensuite été placées dans l'électroporateur (BTX, A division of Genetics, Inc. Electro Cell Manipulator, ECM 395) pour être exposées à un choc électrique de 1.5 kV. Par la suite, un volume de 500 µL de milieu SOC a été ajouté stérilement dans chacune des cuvettes. Finalement, un volume de 100 µL de ce mélange a été déposé (stérilement) et étalé sur une gélose d'agar contenant seulement de l'ampicilline (100 µg/mL). Les géloses ont été incubées (à l'envers) à 37°C pendant la nuit afin de permettre aux bactéries de pousser en colonies. La gélose a été conservée à 4 °C.

1.3.2 Milieux de culture et géloses

Pour la fabrication d'un litre de milieu SOC (Invitrogen), ont été ajoutés : 20 g de bacto-tryptone, 5 g de bacto "yeast extract", 0.5 g de NaCl, 10 mL de 250 mM KCl et 20 mL de 2 M glucose. La solution bien mélangée a ensuite été autoclavée, et un volume de 5 mL d'une solution stérile de 2 M $MgCl_2$ a été ajouté. Pour ce qui est du milieu LB (Invitrogen), pour un litre, ont été ajoutés 10 g de bacto-tryptone, 5 g de "bacto yeast extract" (extrait de levure) et 10 g de NaCl. La solution bien mélangée a aussi ensuite été autoclavée. Dans le cas des géloses, 15 g de bacto-agar ont été ajoutés avant stérilisation.

1.3.3 Méthode rapide UFX (Cormack et Somssich, 1997)

Pour analyser les clones obtenus lors de la transformation des bactéries (*E. coli*), la méthode rapide de UFX "ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction" a été utilisée. Cette méthode a l'avantage de pouvoir effectuer une digestion directement sur une culture bactérienne qui a été incubée pendant la nuit, et qui, comme son nom l'indique, se réalise rapidement. Ceci permet de vérifier si l'insert est effectivement présent dans le plasmide et s'il est de la bonne taille. Pour ce faire, 19 des clones (colonies) obtenus lors de la transformation ont été repiqués sur une gélose d'agar numérotée et en parallèle dans 2 mL de milieu de culture LB contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. Ces colonies ont été incubées à 37 °C pendant la nuit (avec agitation pour la culture liquide). Pour chacun des clones, un volume de 200 μ L de la culture bactérienne a été déposé dans un tube Eppendorf de 1.5 mL, ensuite un volume de 200 μ L de solution II (1% SDS, 0.2 N NaOH) a été ajouté et le tube a été inversé 4 fois et enfin, un volume de 200 μ L de solution III (acétate de potassium 3 M, pH 5.5) a été ajouté. Après avoir inversé le tube 4 fois il a été centrifugé 2 minutes à 14000 rpm, le surnageant a été transféré dans un nouveau tube propre de 1.5 mL avec 500 μ L d'isopropanol 100% et mélangé par inversion. Le tube a été centrifugé une minute à 14000 rpm et le surnageant éliminé. Ensuite, un volume de 500 μ L d'éthanol 70 % a été ajouté sur le culot et le tube a été re-centrifugé une minute à 14000 rpm, et le surnageant éliminé. Les culots ont séché sur la paille environ 10 minutes pour éliminer l'éthanol, et ont été dissous dans 40 μ L de TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA).

Pour faire la digestion des 19 clones, une solution stock de digestion pour 22 clones a été faite. Pour ce faire, 5 μL de chacune des enzymes de restriction *Bam*HI et *Xho*I, 44 μL de tampon de digestion 10 X (buffer H, pharmacia) et 210 μL d' H_2O ont été mélangés dans un tube Eppendorf de 1.5 mL. Ensuite, ce mélange a été aliquoté dans 19 tubes Eppendorf de 1.5 mL, soit 12 μL par tube et 8 μL de l'ADN obtenu par "UFX" ont été ajoutés aux échantillons. Après une légère agitation, les tubes ont subi une centrifugation brève de 5 secondes et ont été incubés à 37 °C pour 2 heures. Après la digestion, 10 μL des 19 échantillons ont été déposés sur gel d'agarose 1% environ 1 heure à 100 Volts. Les échantillons positifs, ceux qui contiennent l'insert de la bonne taille, ont été repiqués dans du milieu LB en vue d'y faire une mini-préparation (Quiagen) pour ADN, pour envoyer au séquençage. L'ADN a été conservé à -20 °C.

1.4 Séquençage

Les clones ont été séquencés dans un séquenceur automatique (ABI PRISM, 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer). Sa méthode de séquençage repose sur le principe des didéoxy terminaux par lequel des analogues nucléotidiques spécifiques terminent la synthèse des nouveaux brins d'ADN à des bases spécifiques (Sanger et al., 1977). Deux amorces (figure 11) ont été utilisées pour le séquençage de l'insert dans le vecteur pFastBac1, FAST-F et FAST-R. L'amorce FAST-F séquence à partir de l'extrémité 5' de l'insert tandis que l'amorce FAST-R part de l'extrémité 3' de l'insert.

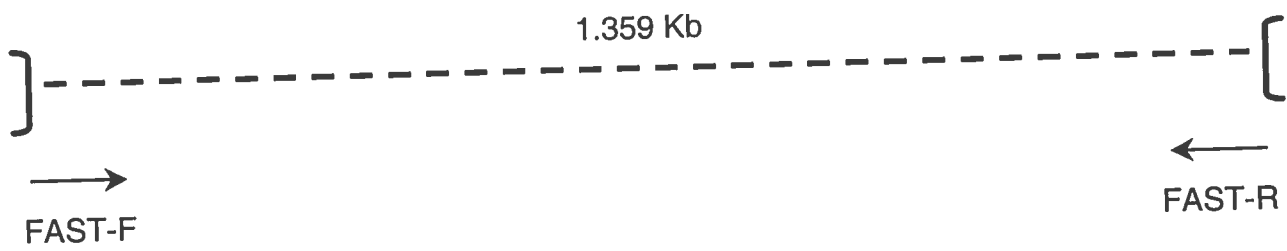
2. PRODUCTION DU BACMIDE RECOMBINANT

2.1 Transformation d'*Escherichia coli* (DH10Bac) pour la transposition

La souche bactérienne d'*E.coli* utilisée pour la transformation est DH10Bac, ces cellules compétentes sont fournies dans la trousse du système d'expression du baculovirus (Bac-To-Bac Baculovirus Expression Systems, Life Technologies). Ces cellules compétentes contiennent un bacmide (un gros plasmide) qui confère la résistance à la kanamycine et qui peut compléter une délétion lacZ présente dans le chromosome pour former des colonies qui sont bleues (Lac +) en présence de substrat chromogénique comme le Bluo-gal ou le X-gal et de l'inducteur IPTG. Le bacmide recombinant est construit en transposant l'élément mini-Tn7 du plasmide pFastBac1

FIGURE 11 : Amorces utilisées lors du séquençage.

Les amorces FAST-F et FAST-R ont été utilisées lors du séquençage du fragment de 1.359 Kb, amplifié avec les amorces DNVP4A et RSV6G. Ces deux amorces sont situées à chacune des extrémités de l'insert dans pFastBac1.

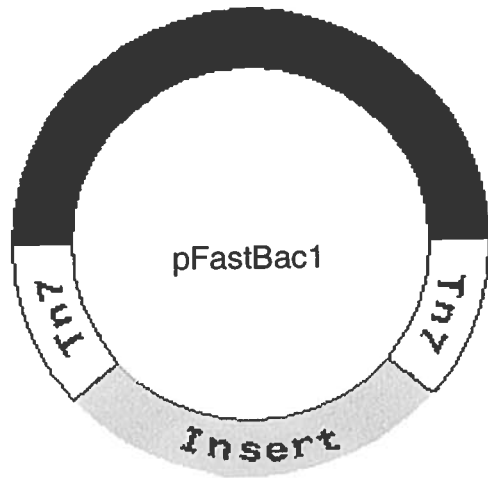


FAST-F Primer, 24 mer : 5' CTA TAG TTC TAG TGG TTG GCT ACG 3'

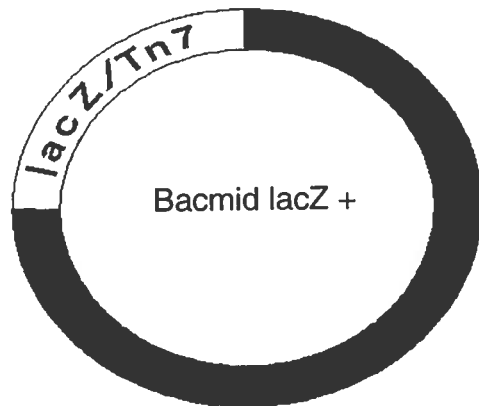
FAST-R Primer, 20 mer : 5' CTA CAA ATG TGG TAT GGC TG 3'

FIGURE 12 : Transposition

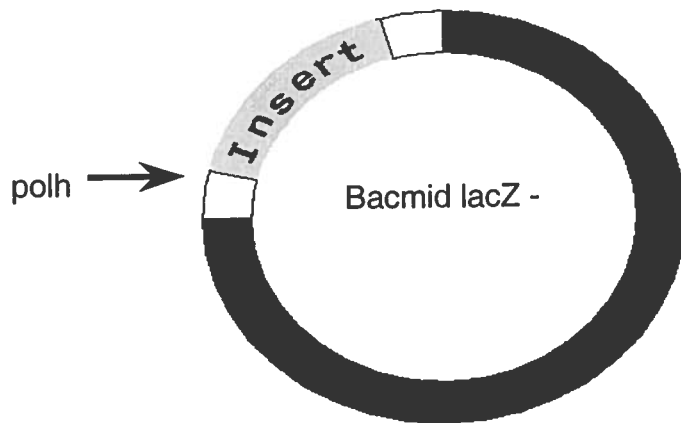
Pour effectuer la transposition de l'insert (VP4-6glycine-G) du vecteur pFastBac1 dans le bacmide du baculovirus, ce vecteur a été transformé dans des bactéries compétentes DH10Bac contenant le bacmide lacZ+. L'élément mini-Tn7 du plasmide donneur pFastBac1 a été transposé au site d'attachement mini-attTn7 du bacmide, cette transposition interrompt l'expression du peptide lacZ α donc on obtient des bactéries DH10Bac avec le bacmide du baculovirus qui contient le gène qu'on veut exprimer, soit VP4-6glycines-G, sous le contrôle du promoteur de la polyhédriine.



Transformation
de DH10Bac



Transposition



donneur au site d'attachement mini-attTn7 du bacmide en présence des protéines de transpositions fournies par le plasmide "helper" (pMON7124) présent dans les cellules DH10Bac, l'insertion de mini-Tn7 dans le site d'attachement mini-attTn7 sur le bacmide interrompt l'expression du peptide lacZ, donc les colonies contenant le bacmide recombinant sont blanches par rapport aux colonies bleues qui portent le bacmide non modifié (figure 12). Pour ce faire, les cellules compétentes étaient décongelées sur glace fondante (0 °C). Après avoir été décongelées, 100 µL de ces cellules ont été déposés dans un tube de polypropylène stérile de 15 mL (Falcon, # 2059) avec environ 10 ng du plasmide donneur recombinant, pFastBac1 contenant l'insert, le tube a été secoué légèrement en tapant sur le côté du tube pour mélanger l'ADN avec les cellules et déposé sur glace fondante pour une période de 30 minutes. Les cellules ont ensuite été exposées à un choc thermique pendant 45 secondes à 42 °C, et immédiatement remises sur glace pour une période de 2 minutes. Par la suite, un volume de 900 µL de milieu SOC a été ajouté stérilement au tube puis incubé à 37 °C avec agitation pendant 4 heures. Finalement, différents volumes (50, 100 et 200 µL) de ce milieu de culture ont été déposés (stérilement) et étalés sur une gélose de Luria Agar contenant de la kanamycine (50 µg/mL), de la gentamycine (7µg/mL), de la tetracycline (10 µg/mL), du Bluo-gal (100 µg/mL) et de l'IPTG (40 µg/mL). Une quinzaine de minutes furent allouées pour permettre à la solution de pénétrer dans la gélose. Les géloses ont été incubées (à l'envers) à 37 °C pendant la nuit afin de permettre aux bactéries de pousser en colonies. Les géloses contenant des colonies blanches bien isolées ont été conservées à 4 °C. Pour la fabrication d'un litre de Luria agar ont été ajoutés : 10 g de peptone, 140, 5 g de "bacto yeast extract" (extrait de levure), 10 g de NaCl et 12 g de bacto-agar. La solution bien mélangée a ensuite été autoclavée.

2.2 Extraction de l'ADN du bacmide recombinant

Comme les colonies blanches sont celles qui contiennent les bacmides recombinants, quelques-unes d'entre elles ont étéensemencées sur une autre gélose numérotée, du même type, de même que dans un milieu de culture liquide, soit du LB avec de la kanamycine (50 µg/mL), de la gentamycine (7 µg/mL) et de la tetracycline (10 µg/mL), pour s'assurer que la colonie était vraiment blanche. La gélose a ensuite été incubée pendant la nuit (à l'envers) à 37 °C ainsi que le

milieu liquide avec agitation. Les numéros des colonies qui étaient vraiment blanches sur la gélose ont subi une mini-préparation pour ADN à haute masse moléculaire. Pour isoler l'ADN, 1.5 mL de chacune des cultures bactériennes ont été transférés dans des tubes Eppendorf de 1.5 mL et centrifugés à $14\ 000 \times g$ pour 1 minute. Le surnageant a été éliminé et les culots ont été dissous mécaniquement dans 300 μL de la solution I (15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rnase A). Par la suite, un volume de 300 μL de solution II (0.2 N NaOH, 1% SDS) a été ajouté et les tubes ont été légèrement secoués pour mélanger et incubés 5 minutes à la température de la pièce. Après 5 minutes, un volume de 300 μL de solution III (3 M d'acétate de potassium (pH 5.5)) a été ajouté en mélangeant doucement pendant l'ajout et les tubes ont été placés sur glace fondante 10 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à $14\ 000 \times g$ pendant 10 minutes. Les surnageants ont été transférés dans un nouvel Eppendorf propre avec 800 μL d'isopropanol absolue, les tubes ont été inversés à quelques reprises pour mélanger et placés sur glace fondante 10 minutes. Les tubes ont ensuite été centrifugés à $14\ 000 \times g$ pendant 15 minutes, les surnageants ont été éliminés et 500 μL d'éthanol 70% ont été ajoutés sur chacun des culots. Les tubes ont été inversés à quelques reprises pour nettoyer le culot et centrifugés à $14\ 000 \times g$ pendant 5 minutes. Les surnageants ont été éliminés le plus possible et les culots ont séché à l'air libre environ 10 minutes. Enfin, les culots ont été dissous dans 40 μL de TE. Pour s'assurer que la préparation était correcte, un volume de 5 μL de la préparation d'ADN a été analysé sur gel d'agarose 1%. Les échantillons d'ADN ont été conservés à 4 °C.

3. PRODUCTION DU BACULOVIRUS RECOMBINANT

3.1 Transfection de cellules Sf9 avec l'ADN du bacmide recombinant

Environ 1 000 000 de cellules Sf9 (cellules d'insectes *Spodoptera frugiperda*) ont été déposées dans chaque puits d'une plaque de 6 puits (Costar # 3516, 35-mm par puits) dans 2 mL de milieu de culture Sf-900 II SFM (BRL, Cat. No. 10902) contenant les antibiotiques pénicilline/streptomycine à une concentration finale de 0.5X (50 unités/mL de pénicilline et 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine, BRL). Les cellules ont été incubées à 27 °C pendant une heure pour permettre leur attachement. Pendant ce temps, dans des tubes Eppendorf stérilisés de 1.5 mL, 100 μl de milieu de culture Sf-900 II SFM sans antibiotique (les antibiotiques peuvent nuire à la

transfection), 12 μ L des préparations d'ADN des bacmides recombinants et 8 μ L de la solution PLUS Reagent (Life technologies, # 10964-021) ont été mélangés ensemble et incubés pendant 15 minutes à la température de la pièce. Dans d'autres tubes Eppendorf stérilisés de 1.5 mL, 100 μ L de milieu de culture Sf-900 II SFM sans antibiotique et 5 μ L de lipofectamine Reagent (Life technologies, # 10964-013) ont été mélangés. Après l'incubation de 15 minutes, les contenus des deux types de tubes Eppendorf ont été mélangés ensemble et les contenus ont été incubés pendant 15 minutes à la température de la pièce. Ensuite, le milieu de culture Sf-900 II contenant des antibiotiques a été enlevé des puits de la plaque de 6 puits et remplacé par 800 μ L de ce même milieu sans antibiotique. Ensuite, le contenu des tubes Eppendorf, les complexes ADN-PLUS-Lipofectamine Reagent, a été ajouté dans chaque puits en mélangeant doucement avec le milieu de culture. Les plaques ont alors été incubées à 27 °C pendant environ 5 heures et après ce temps, du milieu de culture frais avec antibiotiques a été ajouté pour un volume total de 2.5 mL. Les plaques ont ensuite été incubées à la même température jusqu'aux premiers signes d'infection, soit environ 5 jours.

3.2 Amplification du baculovirus recombinant

Six jours après la transfection, environ 1 000 000 cellules Sf9 ont été déposées dans chaque puits d'une plaque de 6 puits avec 2 mL de milieu de culture et incubées à 27 °C pendant 1 heure pour permettre leur attachement. Après l'attachement des cellules, le milieu de culture a été enlevé et remplacé par 1 mL du milieu qui couvraient les cellules transfectées, donc qui contenaient du virus. Cette plaque a été incubée pendant la nuit à 27 °C et le lendemain, 1 mL de milieu frais a été ajouté et la plaque remise dans l'incubateur pour environ 5 à 7 jours, soit jusqu'à l'infection (premier passage = P1). Pour ce qui est de la plaque de transfection dans laquelle 1 mL a été enlevé, le 1 mL restant a été congelé à -70 °C en ayant pris soin de décoller les cellules pour sa conservation. Cinq jours après le premier passage du baculovirus recombinant, environ 7.5 millions de cellules Sf9 ont été déposées dans un flacon de 75 cc (Sarstedt) avec 15 mL de milieu de culture. Après l'attachement des cellules, le milieu de culture a été éliminé et remplacé par 4 mL de milieu frais et 1 mL du milieu couvrant les cellules infectées du premier passage (P1), donc qui contenait le virus recombinant. Le flacon a été remis à 27 °C pour la nuit pour permettre aux virus d'entrer dans les cellules. Le lendemain, un volume

de 10 mL de milieu de culture frais a été ajouté dans le flacon et celui-ci a été remis dans l'incubateur jusqu'à l'infection (P2). Après que les cellules eurent été infectées, deux flacons de 150 cm² contenant chacun 15 millions de cellules Sf9 chacun ont été infectés avec 2 mL du surnageant de culture du flacon de 75 cm² avec 8 mL de milieu pour un volume total de 10 mL pour la nuit et le lendemain 25 mL de milieu frais ont été ajoutés. Les flacons ont alors été incubés à 27 °C jusqu'à l'infection (P3). Ceci a été fait pour produire une réserve de baculovirus recombinant. Il faut noter que le baculovirus recombinant VP4-RSV a été amplifié ainsi que le baculovirus recombinant VP4 contenant seulement le gène de la VP4 du *GmDNV* (qui a été fait dans notre laboratoire par le Dr. Peter Tijssen) ; ce virus servira de témoin négatif lors de l'immunisation.

3.3 Conservation des baculovirus recombinant

Pour conserver les baculovirus recombinants, des échantillons de 1 mL de la transfection ont été déposés dans des cryotubes de 1.5 mL (Sarstedt) et congelés à -70 °C. Pour ce qui est de la grande réserve de virus, des aliquots de 10 mL ont été déposés dans des tubes de 15 mL (Sarstedt) et congelés à -70 °C.

3.4 Titrage du baculovirus recombinant

3.4.1 Préparation des plaques

Pour déterminer le potentiel infectieux de la réserve de virus, on observe la formation de plages de lyses dans une culture cellulaire immobilisée en monocouche. Pour ce faire, un volume de 2 mL de milieu de culture contenant un million de cellules Sf9 a été déposé dans chacun des puits de deux plaques à 6 puits (*duplicata*) lesquelles ont été incubées pendant 1 heure à la température de la pièce afin de permettre leur attachement. Après l'incubation, la monocouche a été observée avec un microscope inversé pour confirmer l'attachement des cellules et leur confluence à environ 50%. Une fois vérifié, chacun des 6 puits de chacune des plaques ont été bien identifiés selon les dilutions de virus, soit : 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ et 10⁻⁷. Ensuite, le surnageant de chacun des puits a été enlevé et remplacé par 990 µL de milieu frais dans le puits de la dilution 10⁻² et 900 µL pour les 5 autres. Dans le puits de la dilution 10⁻² contenant 990 µL

de milieu, 10 μ L de la réserve de virus à titrer ont été ajoutés. Après avoir mélangé doucement pour répartir le virus uniformément, 100 μ L de ce mélange ont été transférés dans le deuxième puits, soit le puits de la dilution 10^{-3} et ainsi de suite jusqu'à la dilution 10^{-7} . Pour ce dernier, 100 μ L ont été jetés pour garder un volume total de 900 μ L dans chacun des puits. Les plaques ont ensuite été incubées pendant 2 heures à 27 °C avec le virus pour permettre à celui-ci de pénétrer dans les cellules. Pendant ce temps, une bouteille d'agarose 4 % (low gelling temperature, SeaPlaque, FMC corporation No.#50101) stérilisée diluée dans l'H₂O a été placée dans un bain-marie à 40 °C ainsi qu'une bouteille de milieu Sf-900 II Insect Medium 1.3 X (BRL). Lorsque l'agarose a été liquéfiée, rapidement, sous la hotte, 8 mL d'agarose 4% et 24 mL du milieu 1.3 X, soit $\frac{1}{4}$ d'agarose pour $\frac{3}{4}$ de milieu, ont été mélangés dans une bouteille de verre stérile et celle-ci a rapidement été placée dans le bain à 40 °C jusqu'à son utilisation. Après l'incubation du virus avec les cellules, l'inoculum de virus a séquentiellement (de la plus grande à la plus petite dilution) été enlevé des puits et 2 mL du mélange d'agarose dilué ont été déposés très lentement sur la couche de cellules. À cette étape, il faut travailler rapidement pour éviter la dessiccation de la monocouche de cellules et aussi éviter que l'agarose ne durcisse prématurément. Enfin, les plaques sont restées immobiles sous la hotte environ 30 minutes pour permettre à l'agarose de durcir et ensuite elles ont été transférées à 27 °C dans un incubateur humidifié pendant 6 jours.

3.4.2 Coloration au rouge neutre

Après six jours, une coloration au rouge neutre a été faite. Pour ce faire, une solution de 15 mL de rouge neutre 1 X a été préparée pour chacune des plaques à 6 puits : un volume de 14.5 mL de milieu de culture SFM 900 a été ajouté à 0.5 mL de rouge neutre 30X. Ensuite, 1 mL de cette solution a été déposé dans chacun des puits des plaques et celles-ci ont été incubées à 27 °C pendant 2 heures. Le rouge neutre a ensuite été enlevé et les plaques retournées dans l'incubateur pour la nuit.

3.4.3 Calcul du titre

Pour déterminer le titre de l'inoculum employé, les puits où il y avait entre 3 et 20 plages de lyses ont été choisis pour le comptage. Le titre (unité formatrice de plage par mL ; pfu/mL) peut être calculé par la formule suivante :

$$\text{Nombre de virus/mL} = \frac{\text{nombre de plage de lyses}}{\text{facteur de dilution} \times \text{mL d'inoculum/puits}}$$

4. EXPRESSION DES PROTÉINES

4.1 Optimisation de l'expression

Afin d'optimiser la production de protéines, il a fallu optimiser le MOI avec laquelle les cellules ont été infectées ainsi que la durée de l'infection. Le MOI, c'est l'indice de multiplicité, soit le nombre de virus qu'on met par cellules. Pour ce faire, les MOI 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1 et 10 ont été testés et les temps 48h, 72h, 96h, 120h, 144h et 168h ont été testés. Ces tests d'infection ont été faits sur des cellules High5 dans des plaques de 24 puits.

4.2 Expression des protéines *in vitro*

Après l'obtention du baculovirus recombinant, les protéines ont été exprimées. Cette fois, des cellules d'insectes High5 ou BTI-TN-5B1-4 (Invitrogen) ont été utilisées pour l'infection au lieu des cellules Sf9 car ces cellules donnent un meilleur rendement au niveau de l'expression protéique. Pour exprimer le gène de la VP4 avec ou sans épitope, des volumes contenant 15 millions de cellules High5 dans un flacon de 150 cm² ont étéensemencées avec les baculovirus recombinants. Les cellules ont été incubées à 27 °C pendant 1 heure pour permettre leur attachement. Le milieu de culture utilisé était le Express Five SFM (Cat. No. 10486), auquel on a ajouté 90 mL de L-glutamine 200 mM (Gibco BRL, Cat. No. 25030-081) ainsi que des antibiotiques (les mêmes que pour le milieu Sf9). Après l'attachement des cellules, le milieu a été éliminé et les cellules ont été infectées avec un MOI de 0.1 dans un volume total de 10 mL pour la nuit et 25 mL de milieu frais ont été ajoutés le lendemain. Les cellules ont été incubées à 27 °C jusqu'à ce que l'infection soit visible au microscope inversé, soit entre 5 et 7 jours.

4.3 Infection de cellules en suspension dans un fermenteur

Pour augmenter la vitesse de production et aussi pour diminuer les coûts reliés à la production, des cellules en suspension dans des fermenteurs de 1 litre ont été infectées. Pour ce faire, une suspension cellulaire de 500 mL contenant 375 000 cellules/mL ont été infectés avec un MOI de 0.1 pendant 7 jours, soit un total de 187.5 millions de cellules High5 par fermenteur. Pour l'infection, les cellules ont d'abord été déposées dans le fermenteur, ensuite la suspension virale a été ajoutée et le fermenteur a été agité pour mélanger les cellules et le virus. Un temps de contact sans agitation d'environ 2 à 3 heures a été laissé pour permettre aux virus de pénétrer dans les cellules avant que le volume ait été complété à 500 mL.

5. PURIFICATION DES PROTÉINES

Après que les cellules eurent été infectées, le tout a été récolté (cellules et surnageant de culture) et déposé dans des tubes de 200 mL. Ceux-ci ont été centrifugés pendant 15 minutes à 6000 x g à 4 °C dans la centrifugeuse Sorval en utilisant le rotor GSA pour séparer les cellules infectées du surnageant. Ces deux parties, cellules et surnageant, ont été analysées pour leur contenu en protéines.

5.1 Purification à partir du surnageant

5.1.1 Mise au culot des protéines (capsides recombinantes)

Une fois clarifié, le surnageant a été centrifugé à 150 000 x g dans une ultracentrifugeuse Beckman pendant 3 heures à 4 °C en utilisant le rotor Ti50.2. Le surnageant a ensuite été jeté en prenant soin de bien éliminer ce qui restait sur les parois des tubes et les culots ont été dissous dans du TE pH 7.8 (Tris-EDTA). À cette étape, il est très important de bien laver et relaver les tubes où les culots ont été dissous pour éviter de perdre des protéines. Pour une infection de 500 mL, les culots se sont retrouvés dissous dans un volume total d'environ 5 à 8 mL.

5.1.2 Dépôt des protéines sur gradient de CsCl

Comme la densité des capsides vides de *GmDNV* est connue, soit de 1.30 à 1.32 g/cm³ (Arella *et al.*, 1990), des concentrations de 1.3 g/mL et de 1.45 g/mL ont été utilisées pour faire

les gradients de CsCl. Donc, 2.75 mL d'une solution de CsCl de 1.45 g/mL (dilué dans du TE pH 7.8) ont été déposés à l'aide d'une pipette de 5 mL dans un tube Ultra-Clear Beckman de 14 X 89 mm pour rotor SW 41 Ti et ensuite, 6.25 mL d'une solution de CsCl moins dense, soit 1.3 g/mL (dans TE) ont été déposés comme deuxième couche. Les tubes ont ensuite été remplis à 2.5 mm du rebord, soit avec environ 3 mL de la suspension des culots de virus recombinants. Les tubes ont alors été mis dans un rotor SW 41 Ti et centrifugés à 150 000 x g (35 000 rpm) pour la nuit soit environ 16 heures. Ensuite, les bandes visibles dans le gradient ont été récoltées à l'aide d'une aiguille de 22G1½ (Becton Dickinson) et d'une seringue de 1 mL, celles-ci ont toutes été mises ensemble. Les bandes ont ensuite été diluées 5 fois dans du TE et remises dans des tubes pour le rotor 50.2 Ti et recentrifugées à 150 000 x g (35000 rpm) pendant 3 heures. Le culot a enfin été dissous dans du TE, celui-ci contenait le virus recombinant purifié.

5.2 Purification à partir des cellules

Le culot de cellules obtenu après la clarification a été dissous dans environ 10 mL de TE et envoyé à -70 °C pour faire trois cycles de congélation/décongélation pour lyser les cellules et permettre le relâchement des capsides recombinantes. À la dernière décongélation, la suspension de cellules lysées a été centrifugée à 11 000 x g dans une centrifugeuse Sorval en utilisant le rotor SS-34 pendant 15 minutes à 4 °C. Enfin, le surnageant a été déposé sur un gradient de CsCl identique à celui décrit plus haut en suivant le même protocole.

6. MÉTHODES D'ANALYSE DES PROTÉINES

6.1 Électrophorèse de protéines sur minigel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)

6.1.1 Gel de polyacrylamide (Ausubel *et al.*, 1987)

Préparation des différentes solutions :

Acrylamide/bisacrylamide : Le rapport acrylamide/bisacrylamide était de 30%/0.8% : 30g d'acrylamide et 0.8g de N,N'-méthylène-bis-acrylamide ont été solubilisés avec agitation dans 100 mL d'H₂O déionisée. La solution a été filtrée sur un filtre de 0.45 µm et conservée à 4 °C

dans le noir. Les gels de polyacrylamides sont formés par la co-polymérisation d'acrylamide et de bis-acrylamide

Tampon du gel de regroupement (4X Tris-Cl/SDS pH 6.8): 6.05 g de Tris base et 0.4 g de SDS (sodium dodecyl sulfate) étaient solubilisés dans 40 mL d'H₂O déionisée. Le pH a été ajusté à 6.8 avec 1 N HCl et le volume complété à 100 mL avec de l'H₂O déionisée. La solution a été filtrée sur un filtre de 0.45 µm et conservée à 4 °C.

Tampon du gel de séparation (4X Tris-Cl/SDS, pH 8.8): 91 g de Tris base et 2 g de SDS étaient solubilisés dans 300 mL d'H₂O déionisée. Le pH a été ajusté à 8.8 avec HCl 1 N et le volume complété à 500 mL avec de l'H₂O déionisée.

Tampon du réservoir (Tampon d'électrophorèse) 5X: 15.1 g de Tris base, 72 g de glycine et 5 g de SDS étaient solubilisés dans 1 litre d'H₂O déionisée. Le pH devait se situer autour de 8.3 sans ajustement. On obtient donc un tampon concentré qu'il faut dilué 5 fois avec de l'eau déionisée lors de son utilisation.

Solution (fraîchement préparée) de persulfate d'ammonium à 10 %: 0.1 g de persulfate d'ammonium a été solubilisé dans 1 mL d'H₂O. Les radicaux libres du persulfate convertissent les monomères d'acrylamide en radicaux libres qui réagissent avec les monomères inactivés pour commencer la réaction de polymérisation en chaîne (Hames et Rickwood, 1981).

Tétraméthyléthylènediamine (TEMED): le TEMED a été utilisé à environ 0.07%. Celui-ci accélère le taux de formation de radicaux libres à partir du persulfate et catalyse la polymérisation (Hames et Rickwood, 1981).

Tampon pour chargement des échantillons (6X): une solution de 10 mL a été faite à partir de 7 mL du tampon du gel de regroupement pH 6.8, 3 mL de glycérol, 1 g de SDS, 0.93 g de DTT et 1.2 mg de bromophenol bleu, le volume a été ajusté à 10 mL avec de l'eau.

6.1.2 Montage de l'appareil et coulage des gels

L'appareil à électrophorèse pour minigels de protéines ("Mini protean II system", Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, On., Can.) a été installé minutieusement afin d'éviter des fuites de liquide subséquentes et en prenant soin de bien choisir les espaceurs et les peignes correspondants, soit de 1 mm chacun. Le gel de séparation, d'une concentration de 10 % a d'abord été coulé. Il était constitué de 5.00 mL de la solution acrylamide-bisacrylamide, 3.75 mL de tampon de séparation (4X Tris-Cl/SDS, pH 8.8), 6.25 mL d'H₂O déionisée, 50 µl de persulfate d'ammonium 10% fraîchement préparé et finalement 10 µl de TEMED. Le persulfate d'ammonium et le TEMED ont été ajoutés après que la solution ait été dégazée. Une fois coulé, le gel de séparation était recouvert d'un mince film d'isobutanol qui permettait d'obtenir une surface uniforme dans le haut du gel lorsque polymérisé (environ 25 minutes). Le surplus d'isobutanol était enlevé et le dessus du gel nettoyé avec de l'eau. Ensuite, le gel de regroupement était coulé. Ce dernier était constitué de : 0.65 mL de la solution acrylamide-bisacrylamide, 1.25 mL du tampon de regroupement (4X Tris-Cl/SDS, pH 6.8), 3.05 mL d'H₂O déionisée, et 25 µl de persulfate d'ammonium et un volume de 5 µL de TEMED a été ajouté après que la solution ait été soumise au vacuum.

6.1.3 Préparation des échantillons et chargement de ceux-ci

Les échantillons ont été mis en présence du tampon de chargement des échantillons, par exemple pour 40 µL d'échantillon, un volume de 8 µL de tampon 6 X a été ajouté. Les échantillons ont ensuite été bouillis à 100 °C dans l'eau pendant 5 minutes pour éliminer les protéases. Enfin, 10 µL des échantillons ont été déposés dans chacun des puits.

6.1.4 Électrophorèse des protéines

Le voltage était ajusté à 200 volts sur un power pac 200 de BioRad. Lorsque le front de migration ("bleu") avait atteint le bas du gel (environ 50 minutes), l'électrophorèse était alors arrêtée et le gel minutieusement décollé pour être ensuite déposé dans la solution colorante choisie ou encore dans un appareil pour transfert de protéines sur une membrane (immunobuvardage).

6.2 Coloration des protéines au bleu de Coomassie

La solution de coloration au bleu de Coomassie a d'abord été faite, 500 mL de méthanol, 0.5 g de Coomassie brillant bleu R-250 (Bio-Rad), 100 mL d'acide acétique et 400 mL d'H₂O ont été mélangés pour donner une solution d'un volume total de 1 litre. Il est à noter que le bleu de Coomassie a d'abord été dilué dans le méthanol avant d'ajouter l'acide acétique et l'H₂O déionisée. Cette solution permettait une coloration du gel en 30 minutes. La décoloration s'est effectuée dans une solution aqueuse de décoloration constituée de 40% méthanol et 10% acide acétique, pendant la nuit. Le gel a ensuite été mis dans une solution de séchage composée de 20 % d'éthanol et 10% glycérol. Le gel était finalement installé entre deux feuilles de Cellophane (Rose scientifique) et incubé à 37 °C pendant la nuit pour sécher.

6.3 Transfert de protéines et immunobuvardage

6.3.1 Préparation des divers tampons

Tampon de transfert : Dans 500 mL d'H₂O déionisée, 2.213 g de CAPS (3- Cyclohexylamino-1-propanesulfonique acide, Sigma Chemical, St-Louis, USA) furent solubilisés. Ensuite, un volume de 100 mL de méthanol a été ajouté et le pH a ensuite été ajusté à 11 avec du NaOH 1N. Le volume a été complété à 1000 mL avec de l'H₂O déionisée. Donc, ce tampon est composé de 10 mM CAPS, 10 % méthanol (pH 11).

Tampon de lavage (TBS-Tween 0.2%) : Dans 500 mL d'H₂O déionisée 2.42 g de Tris base, 8 g de NaCl, 3.8 mL de 1N HCl et 2 mL de Tween 20 ont été mélangés. Ensuite, le pH a été ajusté à 7.6 avec du 1N HCl. Enfin, le volume a été complété à 1000 mL avec de l'H₂O déionisée. (20 mM Tris base, 137 mM NaCl).

Tampon de blocage : Dans 150 mL de tampon de lavage, 7.5 g de lait en poudre (Carnation) ont été solubilisés (5%).

Tampon de révélation A : 100 mM Tris, 100 mM NaCl et 5 mM MgCl₂, pH 9.5.

6.3.2 Montage de l'appareil de transfert (Owl Scientific, Inc.)

L'appareil utilisé est un électrobloteur semi-sec (The Panter, Semi-Dry Electroblotter). Dans ce système, le tampon de transfert contenu dans les papiers filtres est suffisant pour transférer efficacement les molécules, ce qui réduit la quantité de tampon utilisée durant le transfert. La première étape était d'immerger trois papiers filtres d'épaisseur dans le tampon de transfert et de les déposer sur la base de l'électrobloteur. Ensuite, le gel de polyacrylamide a aussi été trempé dans le tampon de transfert et déposé sur les papiers filtres. Ensuite, la membrane de nitrocellulose (0.45 μm , Bio-Rad Laboratories Canada, Ltd., Mississauga, On., Can.) a été équilibrée dans l' H_2O déionisée et déposée sur le gel. Pour terminer, trois autres papiers filtres préalablement immergés dans le tampon ont été déposés sur la membrane. L'appareil a été fermé et le transfert s'est effectué pendant 1 heure à 350 mA (power supply, power pac 200, BioRad).

6.3.3 Révélation des protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose

La membrane a d'abord été bloquée dans 150 mL de tampon de blocage avec agitation pendant une heure. Ensuite, la membrane a été incubée dans une solution contenant le premier anticorps dilué dans le tampon de blocage : anti-*GmDNV* 1/2000 et anti-VRS (18A2B2, Lab. du Dr. Michel Trudel, IAF, Laval, Qc, Can.) 1/25. L'incubation était réalisée pendant une heure à la température ambiante avec agitation. La membrane a ensuite été lavée avec du tampon de lavage trois fois 10 minutes avec agitation. Ensuite, la membrane a été incubée avec le conjugué approprié pendant une heure avec agitation à la température ambiante. Lorsque l'anti-*GmDNV* (produit chez le lapin) était utilisé, un conjugué d'IgG de chèvre (anti-lapin) couplé à l'alkaline phosphatase (anti-rabbit IgG (H + L), BioRad, # cat. 172-1016) a servi, dilué 1/1000 dans le tampon de blocage. Tandis que pour les anti-VRS, un conjugué d'IgG de chèvre (anti-souris) couplé à l'alkaline phosphatase (anti-Mouse IgG (H + L), BioRad # cat. 170-6520) a été utilisé dilué 1/2000. La membrane a alors été lavée trois fois pendant 10 minutes avec agitation dans le tampon de lavage. La révélation a ensuite été réalisée comme suit ; pour une membrane, 33 μL de NBT (4 - Nitroblue Tetrazolium chloride, Boehringer Mannheim, IN, USA, # 1 383 213) et 33 μL de BCIP (X - phosphate/5 - Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphatase, Boehringer Mannheim, IN, USA, # 1 383 221) ont été ajoutés à 10 mL de tampon de révélation A. Ce mélange a été

versé sur la membrane et celle-ci a été incubée dans le noir jusqu'à la révélation, soit environ 10 à 15 minutes. Après l'apparition de bandes (réaction entre l'enzyme et son substrat), la membrane a été lavée sous l'eau courante du robinet pendant environ une minute et laissée sécher à l'air libre pour conserver.

6.4 Dosage protéique par la méthode de Bradford

Les concentrations de protéines des différents échantillons ont été évaluées par une méthode, décrite par Bradford en 1976, qui est basée sur la liaison du bleu brillant de Coomassie G-250 au groupement d'acides aminés. Les dosages ont été faits à l'aide de la technique décrite dans le manuel de techniques de virologiques (Payment et Trudel, 1989) dans un volume de 1 ml. L'albumine sérique bovine (BSA) a été utilisée comme standard de concentration protéique.

6.5 Microscopie électronique

6.5.1 Coloration négative

L'échantillon à analyser a été déposé (100 μ L d'une dilution appropriée) dans un microtube à ultracentrifugation (Beckman) et une grille de cuivre recouverte d'un film de Formvar-carbone a été déposée au fond du tube. Le tube a ensuite été centrifugé dans une centrifugeuse (Airfuge, Air-Driven ultracentrifuge, Beckman) à 20 psi (soit environ 100 000x g) pendant 5 minutes. Ensuite, la grille a été séchée par attouchement sur papier buvard et déposée dans une goutte d'acide phosphotungstique 3% (PTA 3%, pH 6) pendant une à cinq minutes. La grille a ensuite été asséchée de nouveau et une seconde imprégnation de 10 secondes au PTA 3% a été effectuée. La grille sèche a ensuite été examinée au microscope électronique à transmission (Hitachi, 7100).

6.5.2 Immunodétection à l'or colloïdal

L'échantillon à analyser a été déposé sur une grille et après avoir été asséchée, la grille a été trempée dans une goutte de PBS, ensuite 5 minutes dans une goutte de PBS contenant 1% de BSA (blocage) et la grille a été déposée 30 minutes dans une goutte de PBS contenant le premier anticorps (18A2B2 1/20 ou anti-*Gm*DNV 1/500). Ensuite, la grille a été lavée trois fois une

minute dans une goutte de PBS, et re-déposée dans une goutte de PBS contenant le deuxième anticorps (1/10) marqué à l'or spécifique au premier anticorps (British BioCell International, immunogold conjugate, EM Goat anti-Rabbit IgG :5nm #2805 et anti-mouse IgG + IgM :15 nm #1423) pour 30 minutes. Par la suite, la grille a été déposée deux minutes dans une goutte de PBS pour ensuite être trempée trois fois 1 minute 40 sec dans de l'H₂O distillé. Enfin, la grille a été asséchée avec du papier buvard et colorée au PTA pour être observée en M.E.

6.6 Immunofluorescence

Des cellules SF9 ont été infectées dans des puits d'une plaque à 6 puits. Après trois jours d'infection, les cellules infectées ont été fixées avec 2 mL de tampon d'immunofluorescence (tampon phosphate pour IF, 74901, Sanofi diagnostics Pasteur, France) contenant 3% de formaldéhyde 37% pendant 30 minutes à la température de la pièce. Le tampon a ensuite été enlevé et remplacé par 2 mL de tampon IF contenant 3% de TritonX-100 et incubé 30 minutes à TP. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS et incubées pendant une heure avec le premier anticorps (18A2B2 1/25 ou anti-*GmD* 1/500) dilué dans du tampon IF dans un volume total de 500 µL. Le premier anticorps a ensuite été enlevé et les cellules ont été relavées avec du PBS avant d'être incubées pour une heure avec le deuxième anticorps marqué pour l'IF (anti-souris 1/500 ou anti-lapin 1/500) (Anticorps marqués anti-IgG (H+L) souris, fluorescéine 74641 et anti-IgG (H+L) lapin, fluorescéine 74561, Sanofi diagnostics Pasteur, France) auquel du bleu d'Evan a été ajouté dans un rapport 1/1000 (Evan's Blue 74911, Sanofi diagnostics Pasteur, France). Enfin, les deuxièmes anticorps ont été enlevés et les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et elles ont été observées avec un microscope à fluorescence. Les plaques à 6 puits ont été conservées dans le noir à 4°C.

7. ÉTUDES DE LA STABILITÉ DES CAPSIDES FORMÉES DE VP4-VRS SOUMISES À DIFFÉRENTS FACTEURS

7.1 Choix d'une protéase

Pour faire une étude de stabilité, il a fallu choisir une protéase qui ne digérait pas les capsides saines, mais qui était capable de les digérer lorsqu'elles avaient subi un traitement. La trypsine a

été choisie pour cette étude. La marche à suivre a été basée sur un article dans laquelle des tests semblables avaient été effectués (Weichert *et al.*, 1998).

7.2 Stabilité des capsides soumises à la trypsine

Pour effectuer les tests de stabilité, 5 µg de capsides ont été mis en contact avec une quantité égale de trypsine (trypsine 2.5%, Gibco BRL, Cat. No. 15090-046) dans un volume total de 10 µL, complété avec un tampon 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), 100 mM NaCl. Comme témoin positif de l'effet de la protéase sur les capsides, celles-ci ont été bouillies à 100 °C pendant 2 minutes et ensuite incubées avec la trypsine pendant 30 minutes à 37 °C. L'effet de la trypsine a aussi été étudié dans le temps en incubant les capsides avec la trypsine à 37 °C pendant 0, 20, 60 et 90 minutes. Le temps 0 servant de témoin négatif.

7.3 Stabilité des capsides à différents pH

Pour étudier la résistance des capsides à différents pH, 5 µg de capsides (dans un volume de 1 µL) ont été mis en contact avec 9 µL de PBS pH 4 à 9 et laissés à la température de la pièce pour la nuit. Le lendemain, 5 µg de trypsine (dans un volume de 2 µL) ont été ajoutés aux échantillons, préalablement tamponnés à pH7 pour l'activité de la trypsine, et ils ont été incubés à 37 °C pendant 1 heure avant d'être mis sur gel SDS-PAGE. Comme témoin négatif, des capsides ont été laissées à la température de la pièce pendant la nuit dans le tampon à pH 7.0.

7.4 Stabilité des capsides à différentes concentrations de NaCl

Pour étudier la résistance des capsides à différentes concentrations de sel, 5 µg de capsides (1 µL) ont été mis en contact avec 9 µL de NaCl aux concentrations de 100 mM, 300 mM, 500mM et 1 M, et laissés pendant la nuit à la température de la pièce. Le lendemain, 5 µg de trypsine (2 µL) ont été ajoutés aux échantillons et ils ont été incubés à 37 °C pendant 1 heure avant d'être mis sur gel SDS-PAGE. Le témoin négatif était le même qu'avec les pH.

7.5 Stabilité des capsides à différentes températures dans le temps

Pour ce faire, 5 µg de capsides (1 µL) ont été déposés dans 9 µL de tampon pour un volume total de 10 µL. Les échantillons ont été mis à 37 °C et 56 °C pendant 30 minutes, 1 h, 2 h, 6 h et 24 h. Après les incubations, 5 µg de trypsine (2 µL) ont été ajoutés aux échantillons et incubés à 37 °C pendant 1 heure pour ensuite être déposés sur gel SDS-PAGE.

7.6 Stabilité des capsides au gel/dégel

Les échantillons ont été préparés de la même façon que pour les études de température, mais les échantillons ont été mis à -70 °C pour être gelés et dégelés 2, 3 et 5 fois.

8. ÉVALUATION DU POTENTIEL IMMUNOGÈNE ET DE PROTECTION DE LA CAPSIDE RECOMBINANTE PORTANT LA RÉGION 174-187 DE LA GLYCOPROTÉINE G DU VRS

8.1 Souris

Des souris BALB/c (Charles River, St-Constant, Qc, Canada) âgées de trois à quatre semaines ont été utilisées pour les expériences décrites. Cette souche de souris est permissive à la réplication du VRS et représente donc un bon modèle animal, très fréquemment utilisé dans les études sur ce virus.

8.2 Immunisation

Les souris ont été divisées en 7 groupes pour l'immunisation. Les quatre premiers groupes étaient composés de 5 souris et ont été immunisés à trois reprises, à des intervalles de deux semaines par voie intrapéritonéale. Le groupe 1 a servi de groupe témoin négatif avec seulement VP4 à raison de 500 µg/ 100 µL par souris par dose. Les groupes 2, 3 et 4 ont été immunisés avec les capsides recombinantes présentant l'épitope du VRSH à raison de 500 µg, 50 µg et 5 µg respectivement par souris, par dose. Pour les immunisations intrapéritonéales, l'adjuvant complet de Freund (Difco laboratories, Détroit, Michigan, U.S.A., cat. # 0638-60-7) a été utilisé pour la première injection (100 µL pour 100 µL d'échantillon) et l'adjuvant incomplet (Difco laboratories, Détroit, Michigan, U.S.A., cat. # 0639-60-6) pour les deux suivantes. Un cinquième

groupe témoin composé de 3 souris a reçu du VRS Long sans adjuvant ($10^{6.5}$ TCID₅₀/mL produit le 15-09-98) à raison de 0.2 mL par souris.

8.3 ELISA

8.3.1 Prélèvement des sérums

Quatorze jours après la dernière immunisation, un échantillon sanguin a été prélevé de chaque souris par la technique de saignée au plexus rétro-orbital (effectué par le personnel de l'animalerie de l'IAF) et déposé dans des tubes microtainer (Brand Serum Separator Tube, Becton Dickinson, #5960). Les sérums ont été recueillis après une centrifugation des échantillons sanguins à 1 500 x g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse Beckman model J-6.

8.3.2 Préparation de l'antigène ELISA

Le VRS de souche Long a été utilisé comme antigène pour les tests ELISA. Il a été préparé dans les laboratoires du Dr. Michel Trudel (Institut Armand-Frappier, Laval, Qc, Can.) tel que décrit dans le mode opératoire normalisé IAF-SOPQC.96036. En bref, des cellules Hep2 ont été infectées avec le VRS, le virus a été concentré 25 X au PEG 10%, et purifié sur gradient discontinu de saccharose. La quantité de protéines a été déterminée par la méthode de Bradford et celles-ci ont été diluées à une concentration de 10 µg/mL dans du PBS (sans calcium ni magnésium) et déposé dans des plateaux de 96 puits (Lindro/Titertek, Cat. No. 76-231-05, ICN Biomedical, Inc.) à raison de 100 µL/puits, soit 1 µg/puits. Pour le témoin négatif, des cellules Hep2 non infectées et traitées de la même façon sont utilisées.

8.3.3 Procédure

Après l'absorption de l'antigène pendant une nuit à 4 °C, les plateaux étaient vidangés et les sites non spécifiques ont été bloqués en ajoutant 100 µL d'une solution de blocage faite de PBS sans Ca ni Mg, pH entre 7.0 et 7.2 contenant 10 % SFV et incubés au moins 30 minutes à la température de la pièce ou une nuit à 4 °C. Ensuite, la solution de blocage a été vidangée et 200 µL/puits dans les premières rangées des plateaux et 100 µL dans les autres puits de solution de blocage additionnée de Tween 20 à 0.2% ont été ajoutés. Dans les premières rangées, un volume

de 2 μL de sérum a été ajouté (dilution 1/100) et des dilutions 2 en 2 ont été faites directement dans les plateaux, en transférant 100 μL d'un puits à l'autre en pipettant 5 fois pour mélanger. La rangée 12 a été gard e comme référence de bruit de fond (blanc). Après une incubation pendant la nuit à la température de la pièce, les sérums ont été vidangés et les puits lavés trois fois avec une solution d' H_2O déionisée -Tween 0.05%. Ensuite, un antisérum de chèvre dirigé contre les IgG de souris conjugué à la peroxydase de raifort (Sigma, St-Louis, MO,  -U) préparé dans la solution PBS, Tween-20 0.2%, SFV 10%, dilué 1/200 a été ajouté à raison de 100 μL /puits, ce dernier a été incubé 2 heures à la température ambiante. Après l'incubation, 4 lavages ont été faits et la réaction antigène-anticorps a été révélée par l'ajout de 100 μL /puits du substrat de la peroxydase (2 mM Ortho-ph nylediamine (OPD), 3 mM H_2O_2) préparé dans un tampon citrate pH 5.0 (0.05 M acide citrique et 0.1 M phosphate de sodium dibasique anhydre) incubé pendant 5-10 minutes. La réaction de révélation a été arrêtée par l'addition de 100 μL /puits de HCl 1 N et la réaction colorimétrique a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à faisceaux verticaux (Dynatec)   une longueur d'ondes de 492 nm.

Le titre en anticorps des sérums a été exprimé par la plus haute dilution du sérum à laquelle la densité optique lue a été deux fois supérieure à la moyenne des densités optiques des puits servant de bruit de fond.

8.4 Test de protection

8.4.1  preuve virale

Trois semaines après la dernière immunisation, les souris ont été soumises à une épreuve virale avec le virus sauvage. Les souris ont été inoculées au niveau de l'entrée de la voie nasale avec 50 μL de VRS Long contenant 1.5×10^5 TCID₅₀ de particules virales produit sur cellules HEp-2 infectées (lign e continue de carcinome humain, ATCC CCL-23, American Type Culture Collection, Rockvilles, MD,  -U).

8.4.2  valuation du niveau de protection

Le niveau de protection apporté par les antigènes évalués a été déterminé par leur capacité à induire une diminution du taux de réplication virale dans les poumons d'animaux immunisés.

Ainsi, cinq jours après l'épreuve virale, les poumons des souris sacrifiées ont été prélevés afin de déterminer le titre du VRS au niveau des tissus pulmonaires. Pour ce faire, les poumons prélevés ont été mis dans le milieu de prélèvement (milieu Hank's, Hepes 25 mM, gentamycine 50 µg/mL, sucrose 0.218 M, MgCl₂ 30 mM, fungizone 1.0 µg/mL, pH entre 7.0-7.2) et toujours gardés sur glace. Après avoir déterminé la masse des poumons, le volume de la solution a été ajusté pour donner une suspension à 10% (P/V). Les poumons ont ensuite été broyés à l'aide d'un homogénéisateur manuel de 15 mL. Les broyats ont ensuite été centrifugés à 1 000 x g 15 minutes et les surnageants ont été récoltés et congelés par immersion à l'azote liquide et conservés à -70 °C. Les surnageants ont ensuite été titrés en mettant 200 µL de dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³ de chaque surnageant dans des puits de microplaques de 24 puits contenant un feuillet presque confluent de cellules HEp-2 préparées 1 à 2 jours à l'avance à une concentration de 1 x 10⁵ à 2 x 10⁵ cellules/puits. Quatre puits ont été utilisés par dilution. Les microplaques ont été incubés durant 2 heures dans une étuve à 37 °C en atmosphère de 5% CO₂. Les dilutions ont été faites dans du milieu de croissance (milieu Hank 199 : MEM Base Earle (1 :1)(Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, On., Can.), 250 mM bicarbonate de sodium, 50 µg/mL gentamycine, fungizone 1.0 µg/mL et de l'Hepes 10 mM). Après l'incubation de 2 heures, du milieu de culture a été ajouté mais cette fois avec 1% de sérum foetal de veau. La lecture des plateaux a été faite après 5 jours et 7 jours d'incubation à 37 °C. Le nombre de puits infectés pour chacune des dilutions des échantillons a été déterminé par la visualisation sous microscope de l'effet cytopathique caractéristique à l'infection par le VRS. Le titre viral pour chacun des échantillons a été calculé par la méthode de Karber (IAF-SOPQC.96039) et rapporté par gramme de poumon.

RÉSULTATS

1. EXPRESSION DES CAPSIDES RECOMBINANTES FORMÉES DE LA VP4 DU *GmD*DNV PORTANT L'ÉPITOPE G DU VRS

La séquence de la VP4 du *GmD*DNV suivi de 6 glycines et de la partie immunogénique (173-187) de la glycoprotéine G du VRS en C-terminal ont été introduites dans le vecteur pFastBac1 pour ensuite être transposées dans le bacmide du baculovirus AcNPV pour amplification et expression de celui-ci dans les cellules Sf9 et High5 respectivement.

1.1 PCR pour amplification de la VP4 de *GmD*DNV

Le PCR effectué sur l'ADN viral du *GmD*DNV a permis d'amplifier sa VP4 accompagnée de 6 glycines à son extrémité carboxy-terminal pour un fragment total de 1.359 kb (figure 13). La paire d'amorces DNVP4 et RSV6G a permis cette amplification (figure 9). Ce produit de PCR a été digéré (*Bam*HI et *Xho*I) et inséré (ligation) dans le vecteur plasmidique pFastBac1 contenant déjà l'épitope G et lui-même digéré par ces enzymes (*Bam*HI et *Xho*I) (figure 13). Les différents clones obtenus après transformation ont été analysés par la méthode rapide des UFX (Cormack et Somssich, 1997) suivie d'une digestion qui a permis d'identifier un clone potentiellement positif. Ce dernier a été purifié à l'aide d'un kit (Qiagen) et a ensuite été séquencé (ABI Prism 310, Genetic Analyser) dans les deux directions en utilisant les amorces FAST-F et FAST-R (figure 11).

1.2 Transposition

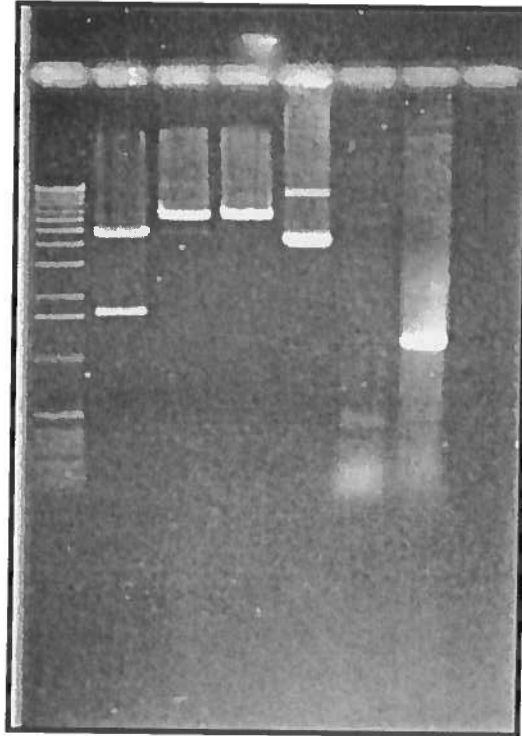
Pour permettre la transposition de l'insert, VP4-6gly-G, dans le génome (bacmide) du baculovirus, des bactéries DH10Bac contenant le génome du baculovirus ont été transformées avec le plasmide pFastBac1 contenant l'insert. Suite à l'incubation de ces bactéries sur gélose, certaines se sont avérées blanches, celles contenant l'insert. L'ADN de six d'entre elles a donc été purifié pour faire une transfection.

1.3 Transfection de cellules Sf9

Les 6 bacmides recombinants ont servi à transfecter des cellules Sf9 dans une plaque de 6 puits à l'aide d'un traitement à la lipofectamine. Trois jours après la transfection, les cellules

FIGURE 13 : PCR et digestions.

PCR effectué sur le *GmDNV* avec les amorces DNVP4 et RSV6G ainsi que les digestions du vecteur pFastBac1 et du produit de PCR avec les enzymes *Bam*HI et *Xho*I (Gel d'agarose 1%).



De gauche à droite :

- 1 : Marqueur de taille (bp), 1 Kb.
- 2 : Vecteur pFastBac1 digéré avec *Bam*HI et *Xho*I
- 3 : Vecteur pFastBac1 digéré avec *Xho*I
- 4 : Vecteur pFastBac1 digéré avec *Bam*HI
- 5 : Vecteur pFastBac1 non-digéré
- 6 : PCR avec des conditions non-efficaces
- 7 : PCR effectué sur 100 ng d'ADN viral de *GmD*NV

commençaient à montrer des signes d'infection, les cellules sont devenues plus grosses avec l'apparition de points noirs à l'intérieur de celles-ci. Six jours après la transfection, 1 mL de chaque puits de la plaque de transfection a été prélevé pour infecter une autre plaque de 6 puits de Sf9 pour amplifier le virus et s'assurer que les clones étaient bel et bien infectieux (premier passage=P1) et ce fut le cas pour quatre d'entre eux.

1.4 Passage sur cellules High5

Afin de vérifier que les clones produisaient bel et bien des capsides qui présentaient l'épitope, une expression préliminaire sur les cellules High5 a été effectuée pour permettre l'expression de celles-ci. Pour ce faire, sept jours après le premier passage sur Sf9 (P1) 200 µL de ce surnageant ont servi à l'infection de cellules High5 dans une plaque de 6 puits dont un de ces puits a été infecté avec 300 µL du virus recombinant fait seulement de VP4 servant comme contrôle sans épitope.

1.4.1 Vérification de la présence de capsides en microscopie électronique

Cinq jours après l'infection des cellules High5, 100 µL de surnageant ont été prélevés et observés en microscopie électronique pour vérifier la présence de capsides. Sur les quatre clones restant, trois produisaient des capsides (figure 14).

1.4.2 Vérification de la présence de l'épitope sur les capsides recombinantes par immunobuvardage de type Western

Cinq jours après l'infection des cellules High5, un immunobuvardage de type western a été fait sur les surnageants des cellules infectées Sf9 et High5. Les immunobuvardages ont été faits avec des anticorps contre le virion *GmDENV* ou des anticorps contre la glycoprotéine G du VRS, pour vérifier la présence de l'épitope G sur les capsides (figure 15). Sur cette figure il faut noter la différence d'expression entre les cellules Sf9 et High5, les cellules Sf9 produisent beaucoup moins de protéines que les cellules High5. Il faut aussi remarquer la différence de masse moléculaire entre la VP4 sans épitope et la VP4 portant l'épitope G du VRS. L'anticorps

FIGURE 14 : Microscopie électronique sur les capsides recombinantes de densovirus formées par la protéine virale VP4 du densovirus *GmDNV* contenant la séquence de la glycoprotéine G du VRSH.

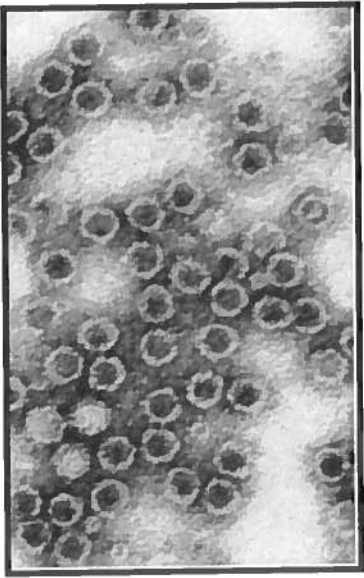
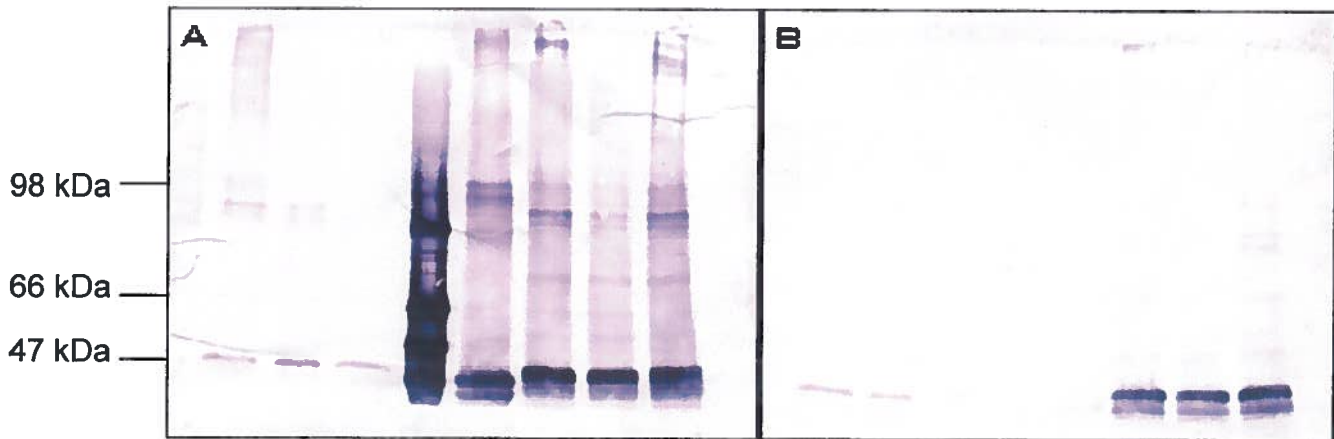


FIGURE 15 : Immunobuvardage de type western sur les capsides recombinantes.

A : Anticorps contre le virion *GmDNV*. **B** : Anticorps contre la glycoprotéine Gdu VRS (18A2B2). Il y a une grande différence d'expression entre les cellules Sf9 et High5 (lignes 2,3,4 et 7,8,9). La capside VP4 sans l'épitope est plus petite (4 Kda) que VP4 + l'épitope (lignes 6 et 7A). L'anticorps contre le VRS reconnaît parfaitement l'épitope sur les capsides recombinantes, mais sans toutefois réagir avec la VP4 sans épitope (ligne 6 B).

Anti-GmDNV**Anti-VRS**

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



- 1 : Marqueur arc-en-ciel
- 2 : VP4+VRS dans les cellules Sf9 (11 jours P.I.) clone #1
- 3 : VP4+VRS dans les cellules Sf9 (11 jours P.I.) clone #3
- 4 : VP4+VRS dans les cellules Sf9 (11 jours P.I.) clone #4
- 5 : Témoin, virus du *GmDNV* en entier (VP1, VP2, VP3 et VP4)
- 6 : Témoin VP4 sans épitope dans cellules High5 (5 jours P.I.)
- 7 : VP4+VRS dans les cellules High5 (5 jours P.I.) clone#1
- 8 : VP4+VRS dans les cellules High5 (5 jours P.I.) clone#3
- 9 : VP4+VRS dans les cellules High5 (5 jours P.I.) clone#4
- 10 : Cellules Sf9 non infectées

dirigé contre la glycoprotéine G reconnaît bel et bien l'épitope porté par la capside et, fait important, cet anticorps ne reconnaît nullement la VP4 sans épitope.

1.4.3 Détection des cellules infectées par immunofluorescence indirecte

Cinq jours après l'infection des cellules High5, une analyse par immunofluorescence indirecte a été faite sur les cellules infectées. L'analyse a été faite avec des anticorps contre la glycoprotéine G du VRS (18A2B2) pour vérifier la présence de l'épitope G dans les cellules infectées avec le baculovirus recombinant contenant la VP4 avec l'épitope G. Les cellules infectées par le clone VP4 + épitope ont été détectées par l'anticorps 18A2B2 alors que les cellules infectées par le clone contrôle VP4 seul n'ont pas été détectées (figure 16).

1.4.4 Détection de l'épitope sur les capsides par immunomarquage indirect à l'or colloïdal.

Cinq jours après l'infection des cellules High5, un immunomarquage indirect à l'or colloïdal a été fait avec les anticorps contre la glycoprotéine G du VRS (18A2B2) pour vérifier la présence de l'épitope G sur les capsides recombinantes formées de la VP4 avec l'épitope G. Ce test est le seul qui assure vraiment que l'épitope est bel et bien présenté à la surface de la capside, tandis que les analyses par immunofluorescence et immunobuvardage pouvaient seulement donner l'information que le clone produisait les capsides avec l'épitope mais sans dire si celui-ci se trouvait à l'intérieur ou à l'extérieur de la capside. Les capsides formées par le clone VP4+VRS ont été marquées par les anticorps couplés aux billes d'or, tel qu'attendu, ces derniers ne se sont pas fixés sur les capsides formées par le clone VP4 seulement (figure 17).

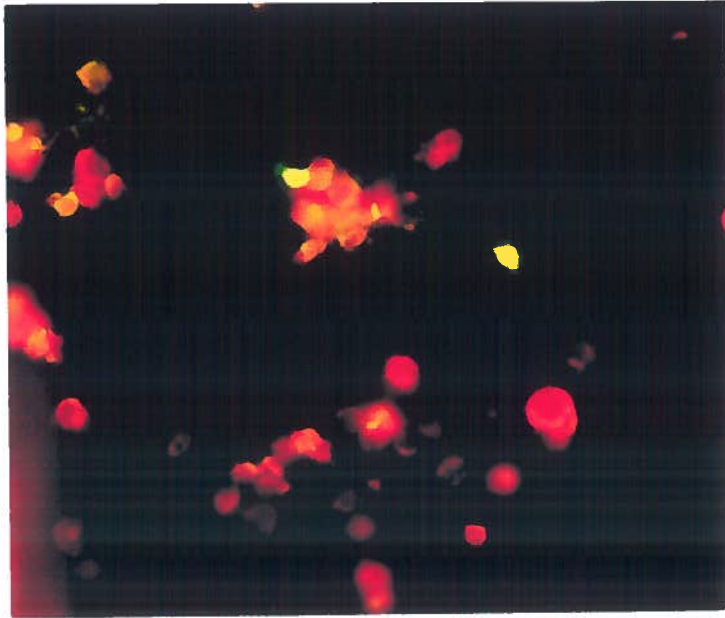
1.5 Amplification des baculovirus recombinants et titrage

À cette étape, un des clones constitué du baculovirus recombinant contenant la VP4 et l'épitope de la protéine G a été sélectionné et amplifié à grande échelle dans les cellules Sf9. Pour procéder à l'amplification de celui-ci, les surnageants des cellules infectées des plaques de 6 puits de Sf9 ont servi à l'infection de flacons de 25 cm², de 75 cm² et de 150 cm². La même chose a été faite pour le baculovirus contenant seulement la VP4. Afin d'assurer l'expression

FIGURE 16 : Immunofluorescence indirecte sur cellules High5

A : Cellules infectées par le clone contenant VP4 seulement. **B** : Cellules infectées par le baculovirus recombinant contenant l'épitope G du VRS. Après cinq jours d'infection, les cellules sont détectées par l'anticorps contre la glycoprotéine G du VRS (18A2B2). La flèche représente une cellule infectée.

A. Anti-VRS avec VP4



B. Anti-VRS avec VP4-VRS

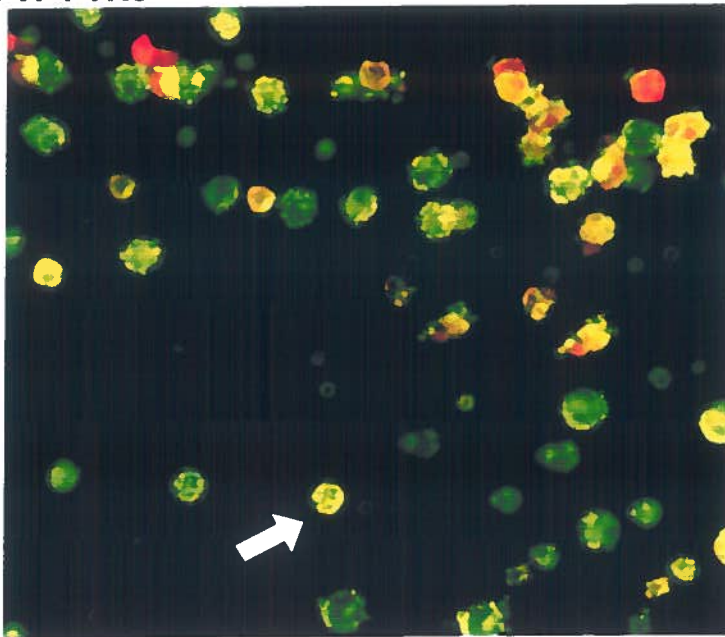
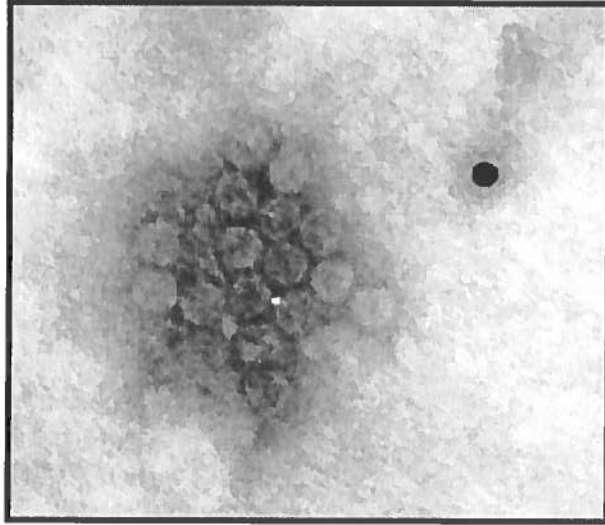


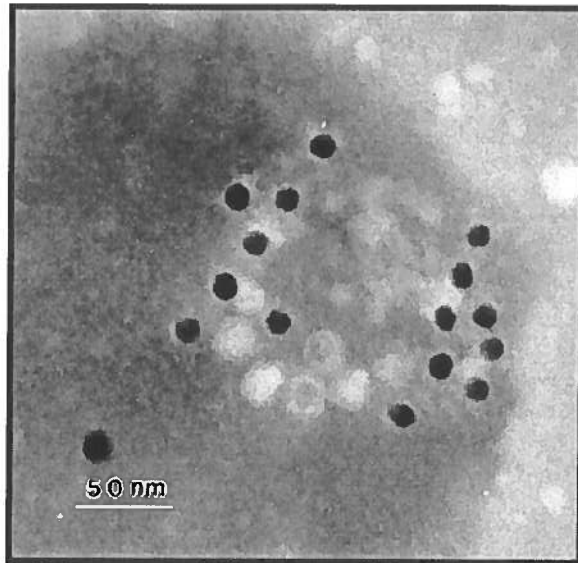
FIGURE 17 : Immunomarquage indirect à l'or.

A : Capsides formées de VP4 sans épitope mises en présence d'anticorps contre la glycoprotéine G. **B** : Capsides formées de VP4 + épitope G mises en présences d'anticorps contre la glycoprotéine G.

A. Anti-VRS avec VP4



B. Anti-VRS avec VP4-VRS



dans les bonnes conditions, les virus recombinants utilisés ont été titrés pour éventuellement permettre d'infecter avec une bonne multiplicité d'infection (MOI). Pour le virus recombinant VP4-RSV, le titre obtenu était de 1.8×10^6 pfu/mL et pour le virus recombinant contrôle le titre était de 1.4×10^6 pfu/mL.

1.6 Expression des protéines dans les cellules High5

Après avoir amplifié les baculovirus recombinants, ceux-ci ont été utilisés pour infecter des cellules HF qui permettent une meilleure expression de protéines. Afin d'optimiser l'expression des protéines, plusieurs MOI d'infection ont été testées dans le temps pour trouver la MOI qui permettrait l'expression des protéines en plus grande quantité. Les meilleures conditions pour l'expression semblaient être avec un MOI d'infection de 0.1 pendant 5 à 7 jours. Donc, des cellules High5 ont été infectées dans des fermenteurs de 1 litre, à raison de 187.5 millions de cellules par 500 ml de milieu avec un MOI de 0.1 pendant 7 jours.

1.7 Purification des protéines par CsCl

Les protéines ont été purifiées à partir du surnageant de culture cellulaire infectée ainsi qu'à partir des cellules infectées. Lorsque les protéines ont été mises sur un gradient de CsCl deux patrons de bandes ont été observés. Pour la purification à partir du surnageant, 2 bandes étaient visibles, mais celle du haut était prédominante. Tandis que, pour la purification à partir des cellules, les deux mêmes bandes étaient visibles, mais cette fois la bande du bas était plus importante. La densité des 2 bandes a été prise: pour la bande du haut la densité était de 1.3 mg/mL et pour la bande du bas la densité était de 1.35 mg/mL.

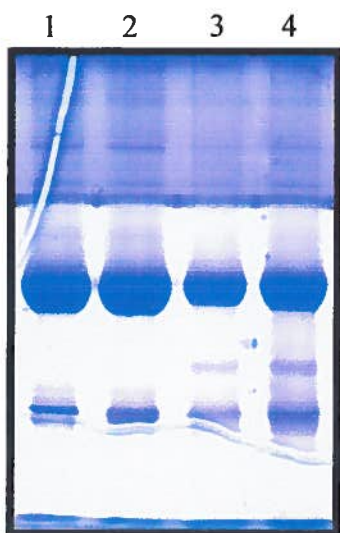
1.7.1 Comparaison des deux bandes du gradient de CsCl par SDS-PAGE, immunobuvardage et microscopie électronique

Les deux bandes venant du gradient de CsCl ont été mises sur gel SDS pour vérifier si elles avaient un patron de migration différent, mais aucune différence n'a été observée (figure 18 A). La différence d'expression de l'épitope sur les deux bandes a aussi été observée par immunobuvardage de type western à l'aide des anticorps 18A2B2 contre l'épitope G, mais

FIGURE 18 : Comparaison des bandes du gradient de CsCl par SDS-PAGE (A), immunobuvardage de type western (B) et microscopie électronique (C).

A : Les deux bandes ne présentent aucune différence sur SDS-PAGE. **B** : L'expression de l'épitope semble être la même sur les deux bandes lors d'un immunobuvardage avec des anticorps contre le VRS. **C** : En microscopie électronique, les capsides de la bande du haut semblent être plus fractionnées.

A. SDS-PAGE



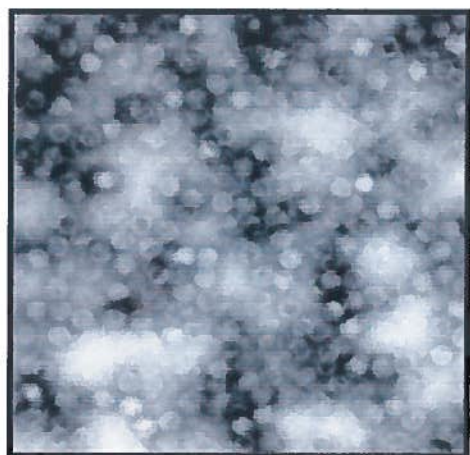
B. Immunobuvardage



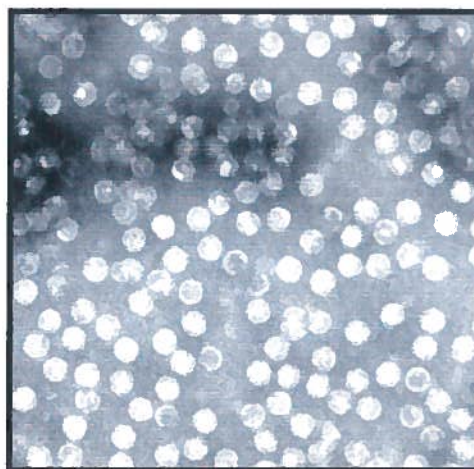
Ligne 1 et 2 : Bande à 1.3 mg/mL (différentes concentrations)
Ligne 3 et 4 : Bande à 1.35 mg/mL (différentes concentrations)

C. Microscopie électronique

Bande à 1.3 mg/ml



Bande à 1.35 mg/ml



aucune différence significative n'a été observée (figure 18 B), la différence apparente sur la figure est seulement due à une quantité moindre de protéines qui a été déposée pour la bande du haut. Enfin, les capsides contenues dans les deux bandes ont aussi été analysées par microscopie électronique et les résultats démontrent que les capsides contenues dans la bande du haut pourraient être un peu plus fractionnées que celles contenues dans la bande du bas qui seraient plus entières (figure 18 C).

1.8 Dosage protéique par la méthode de Bradford

Afin de procéder à l'immunisation des souris avec les capsides recombinantes, celles-ci ont dû être dosées par la méthode de Bradford. Les résultats de densité optique ont été reportés sur un graphique pour évaluer la quantité de protéines recombinantes en comparaison avec une quantité donnée de BSA. Pour les capsides recombinantes formées par VP4 et présentant l'épitope G du VRS, l'expression de celles-ci dans les cellules High-5 a donné un rendement d'environ 14.2 mg de protéines par litre de culture. Dans un même ordre de grandeur, l'expression des capsides formées par VP4 seulement a donné un rendement de 15.5 mg pour un litre de culture (figure 19).

2. ÉTUDES DE STABILITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES SOUMISES À DIFFÉRENTS FACTEURS

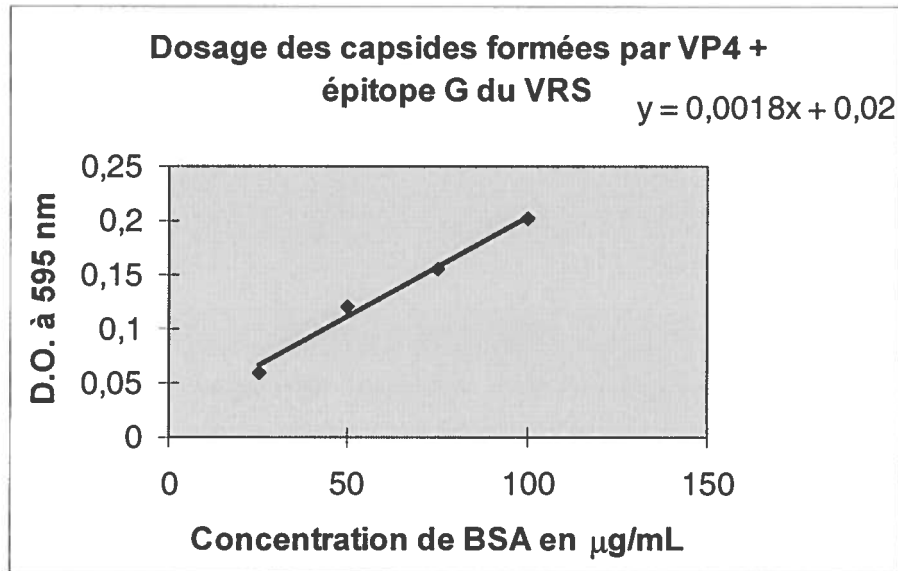
Pour étudier la stabilité des capsides recombinantes soumises à différents facteurs, il a d'abord fallu choisir une protéase qui pouvait digérer les capsides qui étaient abimées par un facteur quelconque sans toutefois digérer les capsides saines. La trypsine s'est avérée la protéase de choix pour ces tests. Tout d'abord, l'effet de la trypsine a été testé sur les capsides sauvages pendant différents temps d'incubation 0, 20, 60 et 90 minutes. À titre de témoin positif, les capsides ont été bouillies à 100 °C pendant 2 minutes afin de les dénaturer pour s'assurer que les capsides étaient bel et bien digérées par la trypsine à la suite d'un stress (figure 20 A).

Le premier facteur à avoir été étudié est l'exposition des capsides à différents pH soit de 4 à 9 pendant 16h à la température ambiante, ensuite neutralisées et soumises à la trypsine. Pour ce test, aucune dégradation des capsides n'a été observée. Suite à l'analyse sur SDS-PAGE, il n'y

FIGURE 19 : Courbe de dosage des protéines.

A : Capsides formées de VP4 et présentant l'épitope G du VRS donnant un rendement d'environ 14,2 mg/Litre de culture. **B** : Capsides formées seulement de VP4 donnant un rendement d'environ 15,5 mg/Litre de culture.

A.



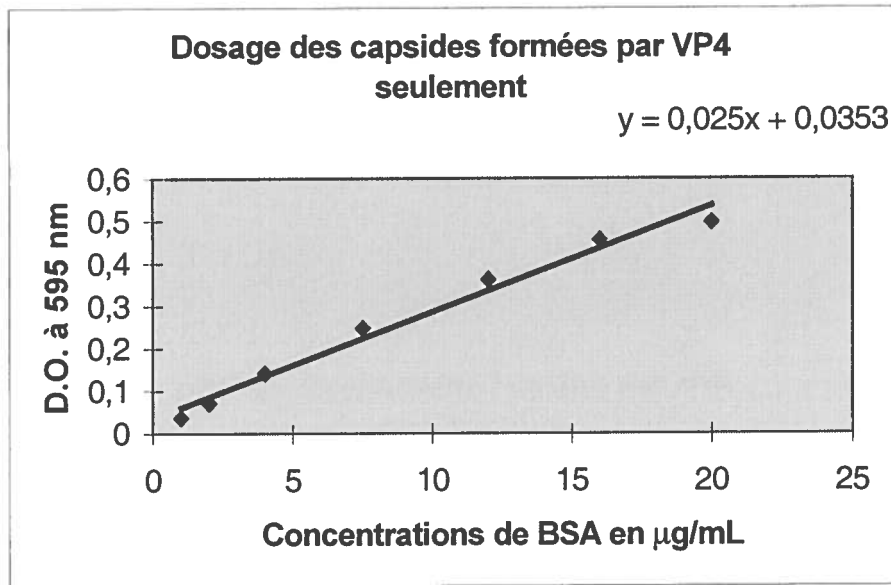
En partant de l'équation de la courbe, $y = 0,0018x + 0,02$, il suffit d'isoler le x et trouver la concentration de protéine de l'échantillon. Soit selon, $x = (y - 0,02)/0,0018$.

Pour $0,2 \mu\text{L}$ d'échantillon, la D.O. est de $0,113$. Donc, la concentration équivalente de BSA est de $51,66 \mu\text{g/ml}$. En reportant la concentration de BSA pour $100 \mu\text{L}$ (volume utilisé pour le dosage), la concentration devient $5,166 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, soit $5,166 \mu\text{g}$ pour $0,2 \mu\text{L}$ d'échantillon. Comme le volume total de l'échantillon est de 1 mL , la concentration de celui-ci est de $25,8 \text{ mg/mL}$.

Pour $0,4 \mu\text{L}$ d'échantillon, la D.O. est de $0,141$. Donc, la concentration équivalente de BSA est de $67,22 \mu\text{g/ml}$. En reportant la concentration de BSA pour $100 \mu\text{L}$ (volume utilisé pour le dosage), la concentration devient $6,722 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, soit $6,722 \mu\text{g}$ pour $0,4 \mu\text{L}$ d'échantillon. Comme le volume total de l'échantillon est de 1 mL , la concentration de celui-ci est de $16,8 \text{ mg/mL}$.

En faisant une moyenne des deux, la concentration totale de l'échantillon se trouve à être de $21,3 \text{ mg/mL}$. Donc, pour environ $1,5$ litres de culture cellulaire le rendement se situe aux alentours de $21,3 \text{ mg}$, soit environ **$14,2 \text{ mg/Litre de culture}$** .

B.



En partant de l'équation de la courbe, $y = 0,0025x + 0,0353$, il suffit d'isoler le x et trouver la concentration de protéine de l'échantillon. Soit selon, $x = (y - 0,0353)/0,0025$.

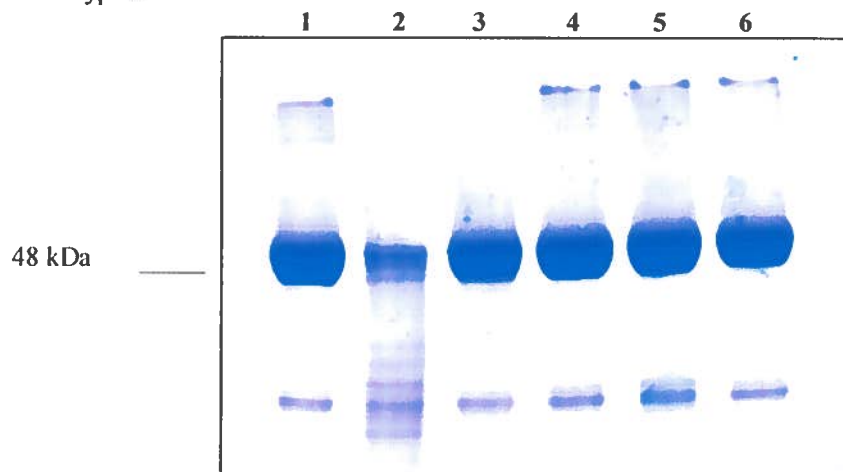
Pour 1 μL d'échantillon, la D.O. est de 0,194. Donc, la concentration équivalente de BSA est de 6,4 $\mu\text{g/ml}$, soit 6,4 μg pour 1 μL d'échantillon. Comme le volume total de l'échantillon est de 1,5 mL, la quantité en protéine de celui-ci est de 9,6 mg.

Pour 2 μL d'échantillon, la D.O. est de 0,335. Donc, la concentration équivalente de BSA est de 12 $\mu\text{g/ml}$, soit 12 μg pour 2 μL d'échantillon. Comme le volume total de l'échantillon est de 1,5 mL, la quantité en protéine de celui-ci est de 9 mg.

En faisant une moyenne des deux, la quantité totale de protéines de l'échantillon se trouve à être de 9,3 mg. Donc, pour environ 0,6 litre de culture cellulaire le rendement se situe aux alentours de 9,3 mg pour ce clone, soit environ **15,5 mg/Litre de culture**.

FIGURE 20 : SDS-PAGE pour l'étude de la stabilité des capsides recombinantes soumises à différents facteurs. **A :** Action de la trypsine sur les capsides dans le temps. **B :** Effet du pH sur les capsides recombinantes. **C :** Effet du NaCl sur les capsides. **D :** Effet de la température à 37°C et 56°C sur les capsides. **E :** Effet du gel et du dégel sur la stabilité des capsides.

A. Effet de la trypsine

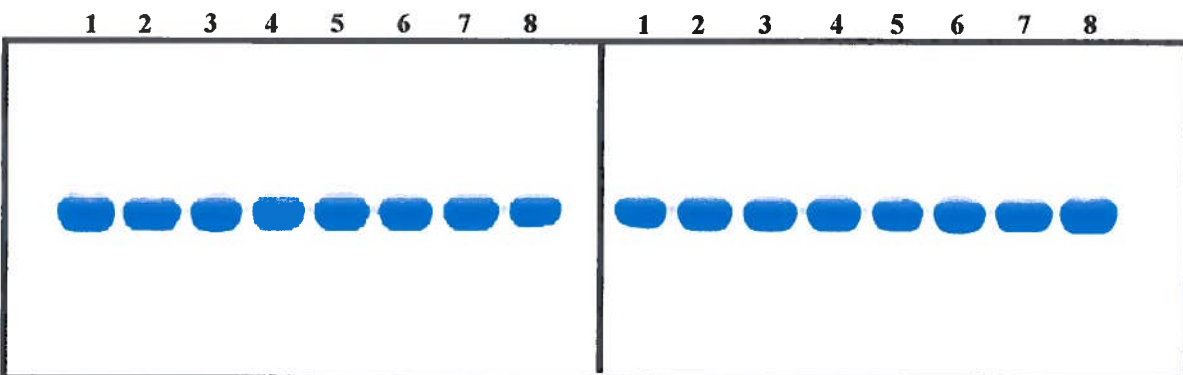


- Ligne 1 : Capsides seules sans traitement
- Ligne 2 : Témoin positif, capsides à 100°C 2 minutes +trypsine 30 minutes à 37°C
- Ligne 3 : Témoin négatif, capsides +trypsine incubation de 0 minute
- Ligne 4 : Capsides + trypsine 20 minutes à 37°C
- Ligne 5 : Capsides + trypsine 60 minutes à 37°C
- Ligne 6 : Capsides + trypsine 90 minutes à 37°C

B. Effet du pH

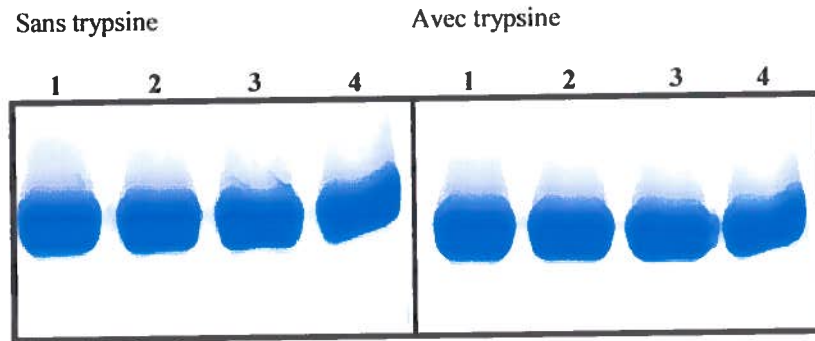
Sans trypsine

Avec trypsine



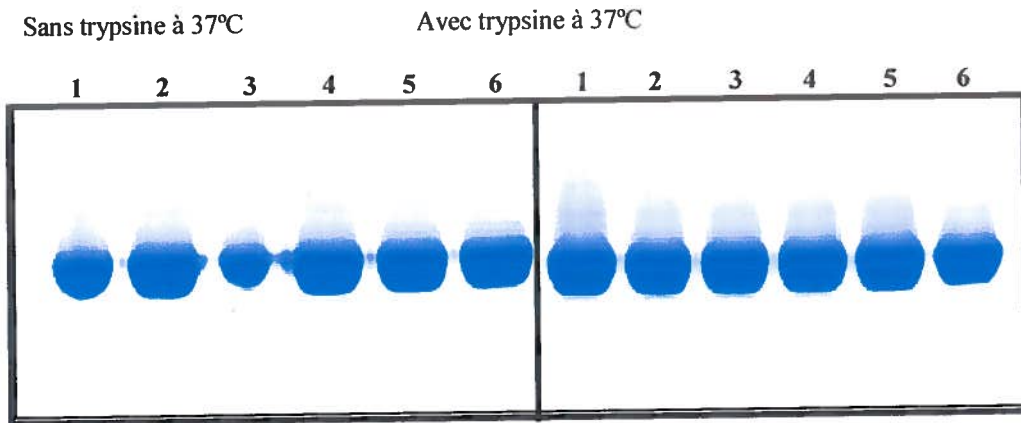
- Ligne 1: Capsides Témoins
- Ligne 2 : Capsides laissées pendant la nuit à la température ambiante
- Ligne 3 à 8 : pH 4 à 9

C. Effet du NaCl

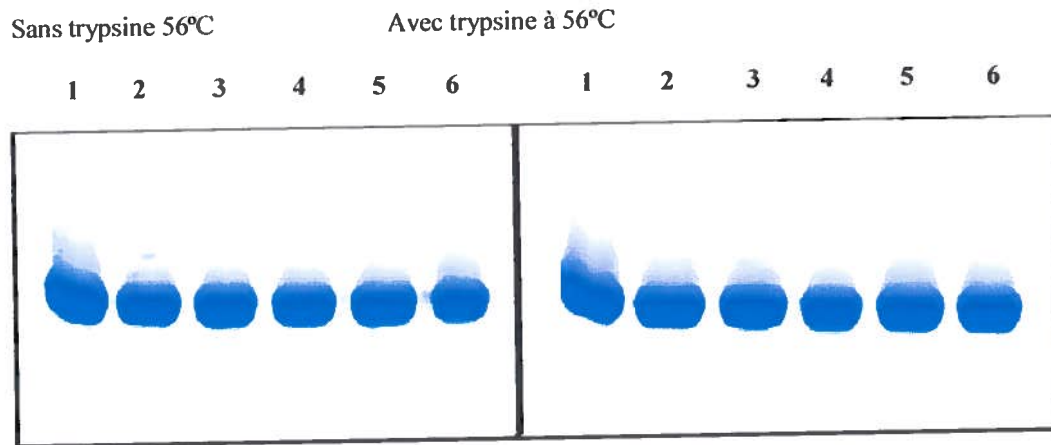


Ligne 1 : 100 mM NaCl
Ligne 2 : 300 mM NaCl
Ligne 3 : 500 mM NaCl
Ligne 4 : 1 M NaCl

D. Effet de la température

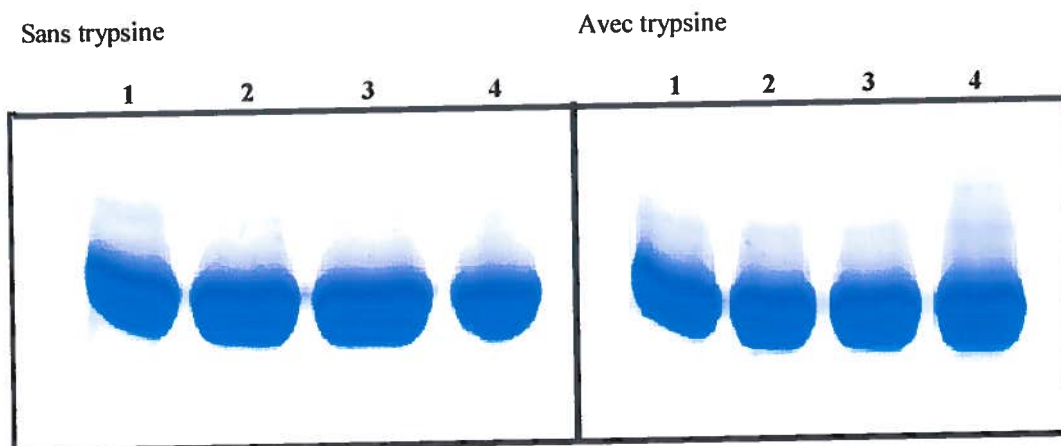


Ligne 1 : Capsides seules sans traitement
Ligne 2 : 37°C pendant 30 minutes
Ligne 3 : 37°C pendant 1 heure
Ligne 4 : 37°C pendant 2 heures
Ligne 5 : 37°C pendant 6 heures
Ligne 6 : 37°C pendant 24 heures



- Ligne 1 : Capsides seules sans traitement
- Ligne 2 : 56°C pendant 30 minutes
- Ligne 3 : 56°C pendant 1 heure
- Ligne 4 : 56°C pendant 2 heures
- Ligne 5 : 56°C pendant 6 heures
- Ligne 6 : 56°C pendant 24 heures

E. Effet du gel et du dégel



- Ligne 1 : Capsides seules sans traitement
- Ligne 2 : 2 fois gel et dégel à -70°C
- Ligne 3 : 3 fois gel et dégel à -70°C
- Ligne 4 : 5 fois gel et dégel à -70°C

avait aucune différence entre les bandes de protéines ayant été exposées aux différents pH et celles ayant subi un traitement à la trypsine en plus (figure 20 B). Le deuxième facteur à avoir été étudié est l'exposition des capsides à différentes concentrations de NaCl, soit 100 mM, 300 mM, 500 mM et 1 M pendant une nuit à la température ambiante. Avant l'ajout de la trypsine, la concentration de NaCl a été réduite à 100mM. Aucune dégradation des capsides n'a été observée non plus dans ces conditions (figure 20 C). Le troisième facteur à avoir été étudié est l'exposition des capsides à différentes températures 37 °C et 56 °C dans le temps, soit des temps d'incubation de 30 minutes, 1 hrs, 2 hrs, 6 hrs et 24 hrs. Encore une fois, aucune dégradation des capsides n'a été observée suite à l'incubation avec la trypsine (figure 20 D). Enfin, le dernier facteur à avoir été étudié est la résistance des capsides au gel et au dégel à une température de -70 °C. Pour l'étude de ce facteur, les capsides ont encore une fois démontré une stabilité hors pair (figure 20 E).

3. ÉTUDES DE L'IMMUNOGÉNÉICITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES

L'évaluation de l'immunogénicité des capsides recombinantes a été effectuée chez les souris BALB/C. Un groupe de cinq souris ont été immunisées pour chacune des doses des antigènes évalués. Les immunisations ont été faites par voie intra-péritonéale à raison de trois doses à deux semaines d'intervalle chacune. Au quinzième jour suivant la dernière immunisation, une saignée au niveau du plexus rétro-orbital a été faite afin de déterminer le taux d'anticorps sériques dirigés contre le VRS. Trois semaines après la dernière injection, les souris ont été soumises à une épreuve avec le VRSH souche Long et cinq jours plus tard, les poumons ont été prélevés pour la détermination du titre viral.

3.1 Évaluation de l'immunogénicité des capsides recombinantes de DNV formées de VP4 et présentant l'épitope G du VRS

Pour l'immunisation, sept groupes de souris ont été injectés. Le premier groupe était un groupe témoin qui a été injecté avec seulement la VP4 du DNV (VP4 500 µg), les groupes II, III et IV étaient des groupes qui ont été injectés avec VP4 présentant l'épitope du VRS à trois différentes doses (VP4-VRS 500 µg, VP4-VRS 50 µg et VP4-VRS 5 µg), le groupe V a servi de témoin+ positif et a été immunisé avec le VRS souche long et enfin les groupes VI et VII ont

servi de témoins négatifs, le groupe VI ayant subi l'épreuve virale mais non le groupe VII. Après trois doses, un très faible titre d'anticorps sériques dirigés contre le VRS a été détecté dans les sérums des souris immunisées avec les capsides recombinantes présentant l'épitope du VRS. Lorsque le VRSH était utilisé comme antigène, on peut voir que pour les groupes I, II, III et IV aucun des titres ELISA n'était assez élevé pour affirmer que les souris avaient produit des anticorps contre le VRSH et ce, avant ou après l'épreuve virale (tableau II). Ces titres ne différaient pas tellement des titres mesurés chez les souris n'ayant pas été immunisées. Par contre, on peut voir que le témoin positif, groupe V, a donné un titre ELISA très fort, soit de 1/85 333 démontrant que les souris ont produit des anticorps contre le VRSH.

Lorsque des extraits de cellules Hep2 (cellules ayant servi à la réplication du VRSH) étaient utilisés comme antigènes pour le test ELISA, on peut voir qu'il n'y avait aucune différence significative avec l'antigène VRSH. À l'exemption du témoin positif qui a donné un titre de 1/12 800.

Les souris immunisées avec les capsides recombinantes présentant la glycoprotéine G du VRSH n'ont pas été protégées de l'infection par le VRSH. En effet, le titre VRSH dans les poumons des souris qui avaient subi l'épreuve virale cinq jours plus tôt était en moyenne d'une $DICT_{50}$ de $4,4 \log_{10}/g$ poumon comparativement aux souris immunisées avec le VRSH (groupe V) chez qui très peu de virus ont été détectés (tableau III).

Tableau II : Immunité humorale des souris immunisées avec les capsides recombinantes

Immunisation	Antigène Positif VRSH long		Antigène négatif cellules Hep2	
	Avant épreuve	Après épreuve	Avant épreuve	Après épreuve
Groupe I (Témoin -) VP4 500 µg	1/240	1/200	1/520	1/800
Groupe II VP4 + G 500 µg	1/650	1/800	1/800	1/1 600
Groupe III VP4 + G 50 µg	1/320	1/200	1/280	1/400
Groupe IV VP4 + G 5 µg	1/960	1/200	1/360	1/400
Groupe V VRSH Long	>1/85 333	>1/64 000	>1/12 800	>1/12 800
Groupe VI Témoin - pour épreuve virale	1/133	1/100	1/1 066	1/200
Groupe VII Témoin - non éprouvé	1/100	1/150	1/100	1/200

Tableau III:Évaluation de la protection des souris immunisées avec les capsides recombinantes

Immunisation	(DICT ₅₀ /log ₁₀)/g de poumon
Groupe I (Témoin -) VP4 500 µg	4,5
Groupe II VP4 + G 500 µg	4
Groupe III VP4 + G 50 µg	4,7
Groupe IV VP4 + G 5 µg	4,4
Groupe V VRSH Long	1,7
Groupe VI Témoin - pour épreuve virale	4,45
Groupe VII Témoin - non éprouvé	0

DISCUSSION

I. EXPRESSION DES CAPSIDES RECOMBINANTES FORMÉES DE LA VP4 DU *GmD*DNV PORTANT L'ÉPITOPE PROTECTEUR G DU VRSH DANS UN SYSTÈME D'EXPRESSION BACULOVIRAL

Depuis le début des années 1990, les baculovirus ont été utilisés avec succès pour exprimer des protéines de capsides virales étant capables de former des particules virales recombinantes qu'on appelle VLPs pour "virus-like particles". Les protéines virales de plusieurs parvovirus ont été exprimées dans ce système (Brown *et al.*, 1991; Kajigaya *et al.*, 1991; Lopez de Turiso *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1992; Saliki *et al.*, 1992; Christensen *et al.*, 1994; Le Gall-Reculé *et al.*, 1996; Tijssen, RÉSULTATS NON PUBLIÉS). Ces VLPs sont exprimées à haut niveau et sont facilement purifiées sur gradient de CsCl. À partir de 1994, ces VLPs ont été utilisées comme plates-formes pour la présentation d'épitopes étrangers (Brown *et al.*, 1994; Miyamura *et al.*, 1994; Sedlik *et al.*, 1995, 1997; Lo-Man *et al.*, 1998; Sedlik *et al.*, 1999). Dans tous les cas, il y avait stimulation d'une réponse immunitaire spécifique à l'épitope présenté. En se basant sur ces résultats, nous avons pensé que le *GmD*DNV, un parvovirus d'insectes, serait un bon candidat pour créer une plate-forme qui permettrait la présentation d'épitope. Celui-ci présentait quelques avantages à être utilisé comme plate-forme.

Son premier avantage était d'être un virus d'invertébrés. En n'étant pas un pathogène de vertébrés, ces organismes ne possèdent pas d'anticorps contre ce virus. Ainsi, l'épitope présenté sur sa capsid ne sera pas masqué par des anticorps contre le *GmD*DNV qui pourraient aller s'attacher à la capsid et cacher l'épitope que l'on veut présenter au système immunitaire. Donc, il n'y aurait aucun risque de neutralisation du vaccin. Son deuxième avantage est son organisation génomique simple qui ne possède pas d'épissage alternatif, il est donc facile d'aller chercher les protéines de structure qui forment la capsid comme la VP4. Son troisième avantage repose sur la structure des parvovirus pour la présentation de l'épitope organisé et structuré grâce à la structure icosaédrale de la capsid que nous avons abordée précédemment. Le dernier avantage est que nous possédions la structure 3D du virus au complet par cristallographie en rayon X. Ceci nous a permis d'insérer un épitope à un endroit qui ne devrait pas interférer avec la structure de la capsid ou dans sa formation et à une position qui se trouvait en surface de la capsid.

L'épitope de protection G du VRSH constituait un bon modèle pour évaluer la possibilité qu'offrait le *GmDNV* à présenter des épitopes. La région 173-187 de la glycoprotéine G du VRSH, a donc été placée à l'extrémité C-terminale de la VP4 du *GmDNV* en étant séparée par une queue de six glycines. Cette queue servant à éloigner l'épitope de la capsidie et ainsi minimiser les interactions de celui-ci avec la capsidie.

Afin d'obtenir des capsides recombinantes de *GmDNV* présentant à leur surface la région 173-187 de la glycoprotéine G du VRSH nous avons utilisé le système d'expression du baculovirus. À l'aide de ce système, nous avons réussi à obtenir l'expression stable de capsides recombinantes portant à leur extrémité C-terminale l'épitope de 15 acides aminés.

Suite à l'expression des capsides, l'analyse en microscopie électronique nous a démontré que des capsides de *GmDNV* étaient bel et bien formées et qu'elles étaient intactes (figure 14). Les capsides ne semblaient pas avoir changé de conformation lorsque comparées avec d'autres capsides vides formées seulement de VP4 sans insertion à l'extrémité C-terminale. Il faut noter ici que les capsides sont vides, c'est-à-dire qu'elles ne contiennent pas d'ADN. Lorsque nous observons le virus sauvage du *GmDNV* en microscopie électronique en coloration négative, il apparaît plus complet (avec l'ADN) donc moins dense aux électrons et de coloration plus blanche ce qu'on appelle électroluminescent. Ceci est dû au fait que le colorant ne peut pénétrer à l'intérieur de la capsidie et glisse autour de celle-ci. Tandis que, lorsque nous regardons des capsides recombinantes ou vides, le colorant peut plus ou moins, dépendant de l'état de la capsidie, pénétrer à l'intérieur des capsides et les rendre plus denses aux électrons, il est donc plus noir ou électrodense avec un contour moins dense donc plus électroluminescent.

L'analyse par immunobuvardage nous a permis de confirmer que l'épitope était bel et bien présent dans les protéines recombinantes produites (figure 15). En effet, l'anticorps monoclonal 18A2B2 nous a permis de détecter l'épitope G sur les protéines recombinantes présentant l'épitope. Il est à noter que cet anticorps n'a pu détecter les capsides recombinantes formées seulement de VP4. Lorsque l'anticorps polyclonal contre le *GmDNV* a été utilisé, nous avons pu observer la différence de masse moléculaire (environ 4 kDa) entre les capsides formées seulement

par la VP4 et les capsides contenant l'épitope G. Grâce à cet immunobuvardage, nous avons pu constater que la différence d'expression entre les cellules SF9 et les cellules High5 était vraiment réelle, car les cellules SF9 ont produit beaucoup moins de protéines que les cellules High5.

Pour appuyer la confirmation de la présence de l'épitope en immunobuvardage de type western, nous avons procédé à une immunofluorescence indirecte sur les cellules High5 infectées (figure 16). Après cinq jours d'infection, les cellules ont été détectées encore une fois à l'aide de l'anticorps monoclonal 18A2B2. Nous avons pu observer que l'anticorps pouvait détecter les cellules infectées par le baculovirus recombinant composé de VP4 avec la glycoprotéine G. Mais toutefois, les cellules infectées par le baculovirus contenant seulement VP4 n'ont pu être détectées, ce à quoi nous nous attendions.

À ce moment nous savions donc que l'épitope était exprimé par le baculovirus recombinant, l'immunobuvardage ainsi que l'immunofluorescence ont permis de confirmer son expression. Donc, afin de vérifier si l'épitope produit se retrouvait vraiment présenté à la surface de la capside recombinante il a fallu faire un immunomarquage indirect à l'or colloïdal (figure 17). Comme nous l'avions espéré, l'anticorps monoclonal 18A2B2 (un anticorps de souris) a bel et bien reconnu l'épitope à la surface de la capside puisque l'anticorps anti-souris couplé à une bille d'or a été se coller à la capside comme nous l'avons constaté en microscopie électronique. Et comme témoin négatif, les mêmes anticorps ont été utilisés pour détecter les capsides formées de VP4 seulement et aucune bille d'or n'a été trouvée collée à une capside. Donc, à ce moment nous étions certains que l'épitope était bien présenté à la surface de la capside, et non à l'intérieur, nous avons donc pu produire les capsides en grande quantité en vue de procéder à l'immunisation de souris pour tester l'efficacité du vaccin.

Une fois l'expression des capsides recombinantes à grande échelle réalisée, celles-ci ont été purifiées sur gradient de chlorure de césium. Lors de la récolte des bandes, nous nous attendions à une seule bande mais à notre surprise il y avait deux patrons de bandes (1,3 mg/mL et 1,35 mg/mL). Lorsque les capsides étaient purifiées à partir du surnageant de culture, la bande du haut était prédominante, alors que lorsqu'elles étaient purifiées à partir des cellules la bande

du bas était plus grosse. Nous avons conclu que la présence de deux bandes était probablement due à une différence dans l'intégrité des capsides. La bande du haut serait composée de capsides plus abîmées, donc plus relâchées et moins denses et celle du bas serait composée de capsides intactes, donc plus refermées et plus denses, se rapprochant plus de la conformation du virus sauvage. Les capsides purifiées à partir du surnageant contiendraient une plus grande proportion de capsides abîmées, vraisemblablement à cause à cause du temps écoulé avant que nous ayons pu les récolter, cinq à six jours. Ces capsides ayant passé plus de temps dans le surnageant, elles avaient probablement commencé à se relâcher. Par contre, les capsides purifiées à partir des cellules étaient composées d'une plus grande proportion de capsides intactes. Ceci est probablement dû au fait que les capsides que nous avons purifiées n'étaient pas exprimées depuis longtemps, donc plus fraîchement assemblées, car elles se trouvaient encore dans les cellules non lysées par le baculovirus.

Afin de nous assurer de la validité de notre hypothèse, nous avons comparé les deux bandes. Premièrement, nous avons comparé leur patron de migration sur gel SDS et aucune différence n'a été observée (figure 18A). Les deux bandes avaient la même masse moléculaire et aucune dégradation n'avait été produite. Deuxièmement, nous avons voulu voir s'il y avait une différence d'expression de l'épitope sur les capsides. Pour ce faire, nous avons fait un immunobuvardage de type western avec des anticorps 18A2B2 dirigés contre l'épitope G. Aucune différence d'expression n'a été observée, la densité de la bande était la même pour les deux bandes (figure 18B). Sur la figure présentée, la bande du bas semble plus foncée mais cette différence apparente est seulement due au fait qu'une quantité moindre de protéines à été mise sur le gel SDS. Enfin, nous avons voulu vérifier si une différence était perceptible dans l'aspect des capsides présentes dans l'une et l'autre bande. L'observation des capsides en microscopie électronique a révélé peu de différence, mis à part le fait que les capsides contenues dans la bande du haut étaient légèrement plus fractionnées que celles contenues dans la bande du bas (figure 18C).

Lorsque nous avons enfin dosé les protéines pour procéder à l'immunisation des souris, nous avons obtenu un rendement tout à fait acceptable par rapport aux statistiques données dans

le protocole du système d'expression du baculovirus. Le rendement moyen de 15 mg/mL que nous avons obtenu semble relativement bon pour ce genre d'expression.

2. ÉTUDES DE STABILITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES SOUMISES À DIFFÉRENTS FACTEURS

Afin d'étudier la stabilité des capsides recombinantes soumises à différents facteurs, il a fallu choisir une protéase qui pouvait digérer les capsides dont l'intégrité avait été altérée par un facteur quelconque sans toutefois digérer les capsides saines. La protéase de choix était donc la trypsine, car plusieurs autres protéases ont été testées et elles étaient toutes capables de digérer les capsides saines. Après chacun des tests, les échantillons étaient déposés sur gel SDS pour évaluer l'effet des traitements sur le patron de migration des capsides. Le premier test à avoir été effectué était de vérifier l'effet de la trypsine sur des capsides saines dans le temps, la trypsine n'avait aucun effet sur les capsides jusqu'à un temps d'incubation de 90 minutes à 37°C. En effet après ce traitement les capsides conservaient le même patron de migration que les capsides saines sans traitement. Par contre, lorsque les capsides étaient dénaturées à 100°C celles-ci étaient presque complètement digérées par la trypsine (figure 20A).

Lorsque nous avons évalué l'effet sur les capsides d'une incubation à différents pH pendant une nuit, nous avons constaté que celles-ci restaient stables dans un grand intervalle de pH, soit de 4 à 9 (figure 20 B). Ce résultat est intéressant puisqu'il signifie que nous pouvons récolter les capsides dans des tampons dont le pH varie sur une large gamme sans que l'intégrité des capsides soit affectée. Lorsque nous avons étudié l'effet du sel NaCl sur les capsides nous avons obtenu les mêmes résultats que pour le pH. Encore une fois, les capsides sont restées stables à des concentrations allant jusqu'à 1 M (figure 20C). Ce résultat est aussi intéressant pour l'utilisation des tampons lors de la récolte des capsides.

Un autre facteur étudié était l'effet direct de la température dans le temps sur l'intégrité des capsides. Lors de cette étude, nous avons pu constater que les capsides étaient stables à des températures de 37 °C jusqu'à 56 °C pour un période d'au moins 24 heures (figure 20 D). Cette qualité est très importante pour l'élaboration d'un vaccin, car elle peut en réduire

considérablement le coût de fabrication. En effet, la plupart des vaccins doivent être conservés à 4 °C ou même à -20 °C. Un vaccin qui reste stable à température relativement élevée est certainement avantageux car cela signifie qu'il pourra être conservé à la température ambiante notamment lors de l'exportation dans d'autres pays.

Le dernier facteur à avoir été étudié est l'effet du gel et du dégel des capsides recombinantes sur leur intégrité, à une température extrême de -70 °C (figure 20 E). Encore une fois, ce facteur n'a en rien influencé la stabilité des capsides. Donc, cette qualité est aussi importante en terme des coûts reliés à la fabrication d'un vaccin, ça permet d'entreposer le vaccin pour une longue période de temps, voire des années, sans affecter son intégrité. Cette qualité permet aussi d'éviter de devoir entreposer le vaccin en plusieurs petits aliquots afin d'éviter le gel et le dégel.

3. ÉTUDE DE L'IMMUNOGÉNÉICITÉ DES CAPSIDES RECOMBINANTES

Lorsque nous avons procédé à l'immunisation des souris, celles-ci ont été séparées en sept groupes (voir tableau II et III). Après l'immunisation, trois doses à deux semaines d'intervalles chacune, les sérums des souris ont été analysés par ELISA pour connaître leur contenu en anticorps dirigés contre le VRSH, soit l'épitope G. Malheureusement, aucune des souris ayant reçu les capsides recombinantes présentant l'épitope G, quelque soit la dose, n'a produit des anticorps contre l'épitope G. Le titre ELISA détecté était seulement dû au bruit de fond du test, car le titre était dans le même ordre de grandeur que celui des souris qui n'avaient pas été immunisées du tout. Par contre, nous sommes certains de la validité du test puisque les souris ayant été immunisées avec le VRSH entier ont produit un très haut titre ELISA. De plus, l'immunisation avec les capsides recombinantes présentant la glycoprotéine G du VRSH n'a eu aucun effet sur la protection contre une infection par le VRSH car le titre viral était dans le même ordre de grandeur que les titres observés chez les souris immunisées avec les capsides formées de VP4 seulement et que ceux observés chez les souris n'ayant pas été immunisées du tout. Les souris immunisées avec le virus étaient par ailleurs protégées puisqu'aucun virus n'a été décelé dans leurs poumons après l'épreuve virale.

Donc, malheureusement notre vaccin n'a pas réussi à induire une protection contre le VRSH chez les souris immunisées. Plusieurs hypothèses sont à considérer pour expliquer l'inefficacité du vaccin. La première hypothèse est que nous pensons que l'épitope exposé à l'extrémité C-terminale a pu être dégradé par des protéases une fois que le vaccin a pénétré dans le sang de la souris. Comme l'extrémité C-terminale se trouvait libre dans l'espace à l'extérieur de la capside, l'épitope inséré était plus accessible aux protéases. Nous avons aussi envisagé la possibilité d'un trop faible rapport entre l'épitope et la capside, l'épitope n'étant peut-être exprimé que sur un petit nombre des VP4s formant la capside. Finalement, une autre possibilité serait une dose inadéquate. Plusieurs doses ont été évaluées, mais comme l'épitope représente un faible pourcentage d'acides aminés par rapport à la capside, environ 3%, peut-être qu'une dose plus importante serait plus appropriée. Récemment, un vaccin de même type dans laquelle l'épitope G du VRSH est exprimé en fusion avec un virus de plante a été réalisé et celui-ci a protégé des souris contre une infection avec le VRSH (Bélanger *et al.*, 2000). Si on compare l'équivalent en molécules d'épitope par rapport aux molécules de la capside, lors de l'immunisation la quantité d'épitope injectée était sept fois plus abondante que ce que nous avons injecté, soit environ 15 µg d'épitope pour notre capside recombinante et 100 µg pour le virus de plante. De plus, selon Harlow et Lane (1988) la recommandation générale de la dose pour une souris est de 50 à 100 µg par dose, donc nos 15 µg d'épitope ne seraient pas suffisants.

Donc, pour augmenter l'efficacité du vaccin, nous pensons que l'épitope pourrait être inséré dans la boucle 2a de la VP4, où l'épitope serait attaché à ces deux extrémités, pour éviter l'action des protéases et pour forcer l'épitope à maintenir sa conformation en forme de boucle. Et de plus, nous croyons qu'une plus forte dose, au moins 1 mg, devrait être expérimentée.

CONCLUSION

Bien que dans les conditions expérimentales utilisées nous n'ayons pas réussi à produire un vaccin efficace, nous avons tout de même pu prouver que la protéine VP4 du *GmDENV* était relativement facile à exprimer dans le système d'expression hétérologue du baculovirus. De plus, nous avons démontré que l'insertion d'un peptide étranger à l'extrémité C-terminale de la VP4 ne dérangeait aucunement l'assemblage des capsides recombinantes car celles-ci étaient toujours capables de former des capsides complètes et stables. La stabilité de ces capsides a pu être confirmée grâce à quelques tests permettant d'évaluer la résistance des capsides recombinantes produites face à plusieurs facteurs environnementaux. De plus, nous avons pu démontrer que le peptide était bien inséré dans les capsides recombinantes grâce à des analyses par immunobuvardage, par immunofluorescence et par immunomarquage à l'or avec un anticorps monoclonal réagissant spécifiquement avec cet épitope. Grâce à ce projet, nous savons maintenant que les capsides recombinantes de *GmDENV* pourraient servir de plates-formes pour porter des peptides étrangers à sa surface en vue de leur présentation au système immunitaire. Il reste à savoir la véritable raison de l'inefficacité des capsides à induire une protection contre le VRSV chez les souris immunisées. Le manque d'immunogénéicité serait-il dû à une dégradation par des protéases, à un faible pourcentage d'expression sur la capside ou à une dose inadéquate? Il serait donc intéressant d'essayer de positionner l'épitope dans une boucle sur la capside tout autant que de répéter l'immunisation avec une dose plus importante.

BIBLIOGRAPHIE

Afanasiev, B.N., E.E. Galyov, L.P. Buchatsky et Y.V. Kozlov. 1991. Nucleotide sequence and genomic organization of *Aedes densonucleosis* virus. *Viol.*, 185:323-336.

Agbandje, M., R. McKenna, M. G. Rossmann, S.O. Kajigaya et Neal S. Young. 1991. Preliminary X-Ray Crystallographic Investigation of Human Parvovirus B19. *Viol.*, 184:170-174.

Agbandje, M., R. McKenna, M.G. Rossmann, M.L. Strassheim et C.R. Parrish. 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins*, 16:155-71.

Agbandje, M, S. Kajigaya, R. McKenna, N.S. Young et M.G. Rossmann. 1994. The Structure of human parvovirus B19 at 8Å resolution. *Virology*, 203:106-115.

Agbandje-McKenna M, A.L. Llamas-Saiz, F. Wang, P. Tattersall et M.G. Rossmann. 1998. Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure*, 6:1369-81.

Akerlind-Stopner, B., G. Utter, M.A. Mufson, C. Orvell, R.A. Lerner et E. Norrby. 1990. A Subgroup-specific Antigenic Site in the G Protein of Respiratory Syncytial Virus Forms a Disulfide-Bonded Loop. *Journal of Virology*, 64:5143-5148.

Amargier, A., C. Vago et G. Meynadier. 1965. Étude histopathologique d'un nouveau type de virose mis en évidence chez le lépidoptère *Galleria mellonella*. *ARCHIV FÜR GESAMTE VIRUSFORSCHUNG*, 15:659.

Anderson, L.J., John C. Hierholzer, Y.O. Stone, C. Tsou et B.F. Fernie. 1986. Identification of Epitopes on Respiratory Syncytial Virus Proteins by Competitive Binding Immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*, 23:475-480.

Anderson, L.J. et C.A. Heilman. 1995. Protective and Disease-Enhancing Immune Responses to Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Infectious Diseases*, 171:1-7.

Arella, M., S. Garzon, J. Bergeron and P. Tijssen. 1990. Physicochemical properties, production, and purification of parvoviruses. *Handbook of Parvovirus*, vol. 1, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, chap. 2, p.12.

Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kigston, D.D. Moore, J.G. Sudman, J.A. Smith et K. Struhl. 1987. *Current protocols in molecular biology*. 2 : 10.2.3

Bachmann, P.A., M. Hoggan, J.L. Melnick, H.G. Pereira et C. Vago. 1975. *Parvoviridae*. *Intervirology*, 5:92.

Bachmann, M.F., U.H. Rohrer, T.M. Kundig, K. Burki, H. Hengartner et R.M. Zinkernagel. 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science*, 262(5138): 1448-1451.

Bachmann, M.F., H. Hengartner, et R.M. Zinkernagel. 1995. T helper cell-independent neutralizing B cell response against vesicular stomatitis virus: role of antigen patterns in B cell induction? *Eur. J. Immunol.*, 25:3445-3451.

Bachmann, M.F. et R.M. Zinkernagel. 1997. The influence of virus structure on antibody responses and virus serotype formation. *Immunol Today*, 17:553-8.

Bando, H., J. Kusuda, T. Gojobori, T. Maruyama et S. Kawase. 1987. Organization and Nucleotide Sequence of a Densovirus Genome Imply a Host-Dependent Evolution of the Parvoviruses. *Journal of Virology*, 61:553-560.

Bando, H., H. Choi, Y. Ito et S. Kawase. 1990. Terminal Structure of a Densovirus Implies a Hairpin Transfer Replication Which Is Similar to the Model for AAV. *Virology*, 179:57-63.

Bando, H., H. Choi, Y. Ito, M. Nakagaki et S. Kawase. 1992. Structural analysis on the single-strand genomic DNAs of the virus newly isolated from silkworm: the DNA molecules share a common terminal sequence. *Arch. Virol.*, 124 :187-193.

Barwise, A.H. et I.O. Walker. 1970. Studies on the DNA of a virus from *Galleria Mellonella*. *FEBS Letters*, 6:13-16.

Bastien, N., M. Trudel et C. Simard. 1997. Protective Immune Responses Induced by the Immunization of Mice with a Recombinant Bacteriophage Displaying an Epitope of the Human Respiratory Syncytial Virus. *Virology*, 234:118-122.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-54.

Bélangier, H., Fleish, N., Cox, S., Bartman, G., Deka, D., Trudel, M., Koprowski, H. et Yusibov, V. 2000. Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB*, 14(14):2323-2328.

Bennett, M.J., M.P. Schlunegger et D. Eisenberg. 1995. 3D domain swapping: a mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci.*, 4:2455-2468.

Bergeron, J., B. Hébert et P. Tijssen. 1996. Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus : Identification of the Allotropic Determinant and Comparaison with Those of NADL-2 and Field Isolates. *Journal of Virology*, 70:2508-2515.

Bergoin, M. et N. Brès. 1968. Lésions tissulaires chez la larve du lépidoptère *Galleria Mellonella* L. atteinte du virus de la denonucléose. *Bulletin Apicole*, XI, No. 1.

Bergoin, M. and P. Tijssen. 1998. Biological and Molecular Properties of Densovirus and Their use in Protein Expression and Biological Control. *The insect Viruses*, Ed. By Lois K. Miller and L. Andrew Ball. Plenum Publishing Corporation, New York, 1998, pp. 141-169.

Berns, K.I. 1991. Parvoviridae and their replication, in *Fundamental Virology* (Fields B.N., Knipe D.M., et al, eds), Raven Press Ltd, New York, pp.817-837.

Blacklow, N.R. and G. Cukor. 1985. Parvoviruses, in *Virology, Fields*, edited by B.N. Field, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.*, Raven Press, New York, p.411.

Boemare, N., G. Croizier et J.C. Veyrunes. 1970. Contribution à la connaissance des propriétés du virus de la denonucléose. *Entomophaga*, 15:327-332.

Boublik, Y., F. X. Jousset et M. Bergoin. 1994. Complete nucleotide sequence and genomic organization of the *Aedes albopictus* Parvovirus (AaPV) pathogenic for *Aedes aegypti* Larvae. *Virology*, 200:752-763.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-54.

Brown, C.S., J.W.M. Van Lent, J.M. Vlak, et W.J.M. Spaan. 1991. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *Journal of Virology*, 65:2702-2706.

Brown, C.S., S. Welling-Wester, M. Feulbrief, J.W.M. Van Lent et W.J.M. Spaan. 1994. Chimeric parvovirus B19 capsids for the presentation of foreign epitopes. *Virology*, 198:477-488.

Cannon, M.J., P.J.M. Openshaw and B.A. Askonas. 1988. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med*, 168:1163-1168.

Cano, F., H. Plotnicky-Gilquin, T.N. Nguyen, S. Liljeqvist, P. Samuelson, J. Bonnefoy, S. Stahl et A. Robert. 2000. Partial protection to respiratory syncytial virus (RSV) elicited in mice by intranasal immunization using live staphylococci with surface-displayed RSV-peptides. *Vaccine*, 18:2743-52.

Christensen, J., S. Alexandersen, B. Bloch, B. Aasted et A. Uttenthal. 1994. Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink. *Journal of General Virology*, 75:149-155.

Casal, J.I. 1999. Use of parvovirus-like particules for vaccination and induction of multiple immune response. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29:141-150.

Clarke, B.E., A.L. Brown, K.G. Grace, G.Z. Hastings, F. Brown, D.J. Rowlands et M.J. Francis. 1990. Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particules produced in bacteria. *Journal of General Virology*, 71:1109-1117.

Collins, P.L., Y.T. Huang, et G.W. Wertz. 1984. Nucleotide sequence of the gene encoding the fusion (F) glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:7683-7.

Collins, P. L., K. McIntosh et R. M. Chanok. 1996. Respiratory Syncytial Virus. *Fields Virology*, third Edition, edited by B.N. Field, D.M. Knipe, P.M. Howley, *et al.* Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, chapitre 44, pp.1313-1351.

Corbeil, S., C. Seguin et M. Trudel. 1996. Involvement of the complement system in the protection of mice from challenge with respiratory syncytial virus Long strain following passive immunization with monoclonal antibody 18A2B2. *Vaccine*, 14:521-525.

Cormack, R. S. et I. E. Somssich. 1997. Ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction (UFX). Elsevier Trends Journals Technical Tips Online. Document PII:S0168-9525(97)01210-9.

Cotmore, S. F. et P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating Parvoviruses of vertebrates. *Advances in virus research*, Vol. 33.

Dumas, B., M. Jourdan, A.-M. Pascaud et M. Bergoin. 1992. Complete Nucleotide Sequence of the cloned Infectious Genome of *Junonia coenia* Densovirus Reveals an Organization Unique among Parvoviruses. *Virology* 191:202-222.

Elango N, G.A. Prince, B.R. Murphy, S. Venkatesan, R.M. Chanock et B. Moss. 1986. Resistance to human respiratory syncytial virus (RSV) infection induced by immunization of cotton rats with a recombinant vaccinia virus expressing the RSV G glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:1906-10.

Everard, M.L. et A.D.Milner. 1992. The respiratory syncytial virus and its role in acute bronchiolitis. *European Journal of Pediatrics*, 151:638-51.

Falsey, A.R, E.E. Walsh et R.F. Betts. 1990. Serologic evidence of respiratory syncytial virus infection in nursing home patients. *J Infect Dis*, 162:568-9.

Fédière G., S. herder, K.N. Kouassi, X. Léry, D. Dauthuille et M. Bergoin. 1991. Restriction map of the *Casphalia extranea* densovirus genome. *Research in Virology*, 142:489-494.

Fishaut, M., D. Tubergen et K. McIntosh. 1980. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity. *Journal of Pediatrics*, 96:179-86.

Flint, S.J., L.W. Enquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello et A.M. Skalka. 2000. Principles of Virology, Molecular Biology, Pathogenesis and Control. ASM Press, Washington, 804 p.

French, T.J., J.J. Marshall et P. Roy. 1990. Assembly of double-shelled, virus-like particules of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J. Virol.*, 64:5695-700.

Giran F. 1966. Action de la denonucléose de lépidoptères sur les mammifères. *Entomophaga*, 11:405-407.

Glezen, W.P. et F.W. Denny. 1973. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. *N Eng J Med*, 288:498-505.

Hall, C.B., E.E. Walsh, C.E. Long et K.C. Schnabel. 1991. Immunity to and frequency of reinfection with respiratory syncytial virus. *Journal of Infectious diseases*, 163: 693-698.

Hames, B.D. and D. Rickwood. 1981. *Gel electrophoresis of proteins.* IRL Press. Washington D.C.

Harlow, Ed et David Lane. 1988. *Antibodies : A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. p.100.

Hertz, M.I., J.A. Englund, D. Snover, P.B. Bitterman et P.B. McGlave. 1989. Respiratory syncytial virus-induced acute lung injury in adult patients with bone marrow transplants: a clinical approach and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*, 68:269-81.

Hodes DS, H.W. Kim, R.H. Parrott, E. Camargo et R.M. Chanock. 1974. Genetic alteration in a temperature-sensitive mutant of respiratory syncytial virus after replication in vivo. *Proc Soc Exp Biol Med*, 145:1158-64.

Hoggan, M. David, Neil R. Blacklow et W. P. Rowe. 1966. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological and immunological characteristics. *Proc. N.A.S.*, 55:1467-1474.

Hoggan, M. David. 1971. Small DNA Viruses, In Maramorosh et E. Kurstak (ed.), *Comparative virology.* Academic Press Inc., New York, Chapter 2, pp.43-77

Hsu, K.L., M.D. Lubeck, A.R. Davis, R.A. Bhat, B.H. Selling, B.M. Bhat, S. Mizutani, B.R. Murphy, P.L. Collins, R.M. Chanock et P.P. Hung. 1992. Immunogenicity of recombinant Adenovirus-respiratory Syncytial Virus Vaccines with Adenovirus Types 4, 5, and 7 Vectors in Dogs and a Chimpanzee. *Journal of Infectious Disease*, 166:769-75.

Johnson PR, M.K. Spriggs, R.A. Olmsted et P.L. Collins. 1987a. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84:5625-9.

Johnson, P.R., R.A. Olmsted, G.A. Prince, B.R. Murphy, D.W. Alling, E.E. Walsh et P.L. Collins. 1987b. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B : evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J Virol.*, 61:3163-3166.

Jousset, F.-X., C. Barreau, Y. Boublik et M. Cornet. 1993. A Parvo-like virus persistently infecting a C6/36 clone of *Aedes aegypti* larvae. *Virus Research*, 29:99-114.

Kajigaya, S., H. Fujii, A. Field, S. Anderson, S. Rosenfeld, L.J. Anderson, T. Shimada, et N.S. Young. 1991. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:4646-4650.

Kapikian, A.Z., R.H. Mitchell, R.M. Chanock, R.A. Shevdoff et C.E. Stewart. 1969. An epidemiological study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (RS) virus infection in children vaccinated with an inactivated RS virus vaccine. *Am J Epidemiol*, 89:405-421.

Kim, H.W., J.G. Canchola, C.D. Brandt, G. Pyles, R.M. Chanock K. Jensen et R.H. Parrott. 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *American Journal of Epidemiology*, 89:422-434.

Kim HW, J.O. Arrobio, G. Pyles, C.D. Brandt, E. Camargo, R.M. Chanock et R.H. Parrott. 1971. Clinical and immunological response of infants and children to administration of low-temperature adapted respiratory syncytial virus. *Pediatrics*, 48:745-55.

Kim, H.W., J.O. Arrobio, C.D. Brandt, B.C. Jeffries, G. Pyles, J.L. Reid, R.M. Chanock et R.H. Parrot. 1973a. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D.C. I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol*, 98:216-25.

Kim HW, J.O. Arrobio, C.D. Brandt, P. Wright, D. Hodes, R.M. Chanock et R.H. Parrott. 1973b. Safety and antigenicity of temperature sensitive (TS) mutant respiratory syncytial virus (RSV) in infants and children. *Pediatrics*, 52:56-63

Kelly, D.C., A.H. Barwise et I.O. Walker. 1977. DNA contained by two denonucleosis viruses. *J Virol*, 21:396-407.

Kurstak, E. et C. Vago. 1968. *Viruses of Invertebrates. Int. virol. I, 1st Int. Congr. Virol., Helsinki*, pp.275-283.

Kurstak, E. et J.R. Côté. 1969. Proposition de classification du virus de la denonucleose (VDN) basée sur l'étude de la structure moléculaire et des propriétés physicochimiques. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences Paris*, 268:616-619.

Kurstak, E. 1972. Small DNA Densonucleosis virus (DNV). *Advances in virus research*, 17:207-241.

Kurstak, E., J.P. Vernoux et L. Brakier-Gingras. 1973. Études biophysiques de l'acide désoxyribonucléique du virus de la densonucléose (VDN). *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, 40:274-284.

Kurstak, E., P. Tijssen et S. Garzon. 1977. Densonucleosis Viruses (Parvoviridea). The Atlas of insects and plants viruses. Ed. by Karl Maramorosh, vol.8 of *Ultrastructure in biological System*, Academic press, N.Y., San Francisco, London, chap.3, p.67-75.

Laemmli, UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-5.

Langedijk JP, W.M. Schaaper, R.H. Melen, J.T. van Oirschot. 1996. Proposed three-dimensional model for the attachment protein G of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 77:1249-57.

Le Gall-Reculé, G., V. Jestin, P. Chagnaud, P. Blanchard et A. Jestin. 1996. Expression of muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP2 and VP3) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins. *J. Gen. Virol.*, 77:2159-2163.

Levine, S., R. Klaiber-Franco et P.R. Paradiso. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 68:2521-2524.

Lo-Man, R., P. Rueda, C. Sedlik, E. Deriaud, I. Casal et C. Leclerc. 1998. A recombinant virus-like particule system derived from parvovirus as an efficient antigen carrier to elicit a polarized Th1 immune response without adjuvant. *Eur. J. Immunol.*, 28:1401-1407.

Longworth, J.F., T.W. Tinsley, A.H. Barwise et I.O.Walker. 1968. Purification of a Non-occluded Virus of *Galleria mellonella*. *J. Gen. Virol.*, 3:167-174.

Longworth, J.F. 1978. Small isometric viruses of invertebrates. *Adv. Virus Res.*, 23:103-157.

Lopez de Turiso, J.A., E. Cortès, C. Martinez, R. Ruiz de Ybanez, I. Simarro, C. Vela et I. Casal. 1992. Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol*, 66:2748-2753.

Luckow, V. A., S.C. Lee, G.F. Barry and P.O. Olins. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 67:4566-79.

Luckow, V. A., et M. D. Summers. 1988. Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 167:56-71.

Martinez, C., K. Dalsgaard, J.A. Lopez de Turiso, E. Cortes, C. Vela et J.I. Casal. 1992. Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity. *Vaccine*, 10:684-690.

Melero, J. A., B. Garcia-Barreno, I. Martinez, C. R. Pringle et P. A. Cane. 1997. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol*, 78:2411-2418.

Meynadier, G., C. Vago, G. Plantevin et P. Atger. 1964. Virose d'un type inhabituel chez le Lépidoptère "GALLERIA MELLONELLA" L. *Revue de Zoologie Agricole et Appliquée*, 63:207-208.

Meynadier, G., G. Mat, J.-C. Veyrunes et N. Bres. 1977a. Virose de type denonucléose chez les lépidoptères. *Ann. Soc. entomol. Fr.*, 13:487-493.

Meynadier, G., P.F. Galichet, J.-C. Veyrunes et A. Amargier. 1977b. Mise en évidence d'une denonucléose chez *Diatraea saccharalis* (Lep. : Pyralidae). *Entomophaga*, 22:115-120.

Miyamura, K., S. Kajigaya, M. Momoeda, S.J. Smith-Gill et N.S. Young. 1994. Parvovirus particules as platforms for protein presentation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91:8507-8511.

Moore, F. N. et D. C. Kelly. 1980. Interrelationships of the Proteins of Two Insect Parvovirus (Densonucleosis Virus Types 1 and 2). *Intervirol*, 14:160-166.

Morris, J.A., R.E. Blount et R.E. Savage. 1956. Recovery of cythopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92:544-550.

Mufson, M.A., C. Orvell, B. Rafnar et E. Norrby. 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.*, 66:2111-2124.

Müller, M., J. Zhou, T.D. Reed, C. Rittmüller, A. Burger, J. Gabelsberger, J. Braspenning et L. Gissmann. 1997. Chimeric papillomavirus-like particules. *Virology*, 234:93-111.

Mullis, K.B. et F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-50.

Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Saiki, G. Horn and H. Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 51:263-73.

Murphy, B.R., G.A. Prince, E.E. Walsh, H.W. Kim, R.H. Parrott, V.G. Hemming, W.J. Rodriguez et R.M. Chanock. 1986. Dissociation between serum neutralizing and glycoprotein antibody responses of infants and children who received inactivated respiratory syncytial virus vaccine. J. Clin. Microbiol.; 24:197-202.

Murphy, B.R. et E.E. Walsh. 1988. Formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccine induces antibodies to the fusion glycoprotein that are deficient in fusion-inhibiting activity. J. Clin. Microbiol., 26:1595-7.

Murphy, F.A, C.M. Fauquet, D.H.C. Bishop, S.A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G.P. Martelli, M.A. Mayo et M.D. Summers. 1995. Virus taxonomy, Springer, Vienna, 585pp.

Navas, L., E. Wang, V. Carvalho et J. Robinson. 1992. Improved outcome of respiratory syncytial virus infection in a high-risk hospitalized population of Canadian children. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada. Journal of Pediatrics, 121:348-54.

Olmsted, R.A., N. Elango, G.A. Prince, B.R. Murphy, P.R. Johnson, B. Moss, R.M. Chanock et P.L. Collins. 1986. Expression of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus by a recombinant vaccinia virus : comparison of the individual contributions of the F and G glycoproteins to host immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7462-7466.

Olmsted, R.A., B.R. Murphy, L.A. Lawrence, N. Elango, B. Moss et P.L. Collins. 1989. Processing surface expression, and immunogenicity of carboxy-terminally truncated mutants of G protein of human respiratory syncytial virus. J. Virol., 63:411-20.

Payment P. et M. Trudel. 1989. Manuel de techniques virologiques. Presses de l'Université du Québec/AUPELF, Universités Francophones, UREF, Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, Université du Québec Laval, Qc, Can., 350 pages. pp.70-72.

Planna-Duran, J., M. Bastons, M.J. Rodriguez, I. Climent, E. Cortes, V. Vela et I. Casal. 1996. Oral immunization of rabbits with VP60 particules confers protection against rabbit hemorrhagic disease. Arch. Virol., 141:1423-36.

Prince GA, A.B. Jenson, V.G. Hemming, B.R. Murphy, E.E. Walsh, R.L. Horswood et R.M. Chanock. 1986. Enhancement of respiratory syncytial virus pulmonary pathology in cotton rats by prior intramuscular inoculation of formalin-inactivated virus. *J. Virol.*, 57:721-8

Pringle CR, A.H. Filipiuk, B.S. Robinson, P.J. Watt, P. Higgins et D.A. Tyrrell. 1993. Immunogenicity and pathogenicity of a triple temperature-sensitive modified respiratory syncytial virus in adult volunteers. *Vaccine*, 11:473-8.

Rose, R.C., W. Bonnez, R.C. Reichman et R.L. Garcea. 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells : in vivo and in vitro assembly of virus-like particules. *J. Virol.*, 67:1936-44.

Sabara, M., M. Parker, P. Aha, C. Cosco, E. Gibbons, S. Parsons et L.A. Babiuk. 1991. Assembly of double-shelled rotaviruslike particules by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins. *J. Virol.*, 65:6994-7.

Saliki, J.T., B. Mizak, H.P. Flore, R.R. Gettig, J.P. Burand, L.E. Carmichael, H.A. Wood et C.R. Parrish. 1992. Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector : use in analysis of viral properties and immunization of dogs. *J. Gen. Virol.*, 73:369-374.

Sanger, F., S. Nicklen et A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5463-7.

Sedlik, C., J. Sarraseca, P. Rueda, C. Leclerc et I. Casal. 1995. Immunogenicity of poliovirus B and T cell epitopes presented by hybrid porcine parvovirus particules. *Journal of General Virology*, 76:2361-2368.

Sedlik, C., M.-F. Saron, J. Sarraseca, I. Casal et C. Leclerc. 1997. Recombinant parvovirus-like particules as an antigen carrier : A novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:7503-7508.

Sedlik, C., A. Dridi, E. Deriaud, M.F. Saron, P. Rueda, J. Sarraseca, J.I. Casal et C. Leclerc. 1999. Intranasal delivery of recombinant parvovirus-like particles elicits cytotoxic T-cell and neutralizing antibody responses. *Journal of Virology*, 73:2739-2744.

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

Simard, C., F. Nadon, C. Séguin et M. Trudel. 1995. Evidence that the amino acid region 124-203 of glycoprotein G from the respiratory syncytial virus (RSV) constitutes a major part of the polypeptide domain that is involved in the protection against RSV infection. *Antiviral Research*, 28:303-315.

Simard, C., F. Nadon, C. Séguin, N. Ngoc Thien, H. Binz, J. Basso, J.-F. Laliberté et M. Trudel. 1997. Subgroup specific protection of mice from respiratory syncytial virus infection with peptides encompassing the amino acid region 174-187 from the G glycoprotein: the role of cysteinyl residues in protection. *Vaccine*, 15:423-432.

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

Stott, E.J., L.A. Ball, K.K. Young, J. Furze et G.W. Wertz. 1986. Human respiratory syncytial virus glycoprotein G expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects mice against live-virus challenge. *J. Virol.*, 60:607-613.

Stott, E.J., G. Taylor, L.A. Ball, K. Anderson, K.K.-Y. Young, A.M. Q. King et G.W. Wertz. 1987. Immune and Histopathological Responses in Animals Vaccinated with Recombinant Vaccinia Viruses That Express Individual genes of Human Respiratory Syncytial Virus. *Journal of Virology*, 61:3855-3861.

Sullender WM, K. Anderson et G.W. Wertz. 1990. The respiratory syncytial virus subgroup B attachment glycoprotein: analysis of sequence, expression from a recombinant vector, and evaluation as an immunogen against homologous and heterologous subgroup virus challenge. *Virology*, 178:195-203.

Sullender, W.M. and J.B. William. 1996. Antigenic and immunogenic analysis of group A and group B respiratory syncytial virus G proteins expressed from recombinant baculovirus. *Journal of General Virology*, 77:641-648.

Suto, C. 1979. Characterization of a virus newly isolated from the smoking-brow cockroach, *Periplaneta fuliginosa* (Serville). *Nagoya J. Med. Sci.*, 42 :13-25.

Taylor, G, E.J. Stott EJ, M. Bew, B.F. Fernie, P.J. Cote, A.P. Collins, M. Hughes et J. Jebbett. 1984. Monoclonal antibodies protect against respiratory syncytial virus infection in mice. *Immunology*, 52:137-42

Tijssen, P., J. van den HURK et E. Kurstak. 1976. Biochemical, Biophysical and Biological Properties of Densonucleosis Virus. I. Structural Proteins. *Journal of Virology*, 17:686-691.

Tijssen, P., T. Tijssen-van der Slikke et E. Kurstak. 1977. Biochemical, Biophysical and Biological Properties of Densonucleosis Virus (Parvovirus). II. Two types of Infectious Virions. *Journal of Virology*, 21:225-231.

Tijssen, P et E. Kurstak. 1979a. A simple and sensitive method for the purification and peptide mapping of proteins solubilized from densonucleosis virus with sodium dodecyl sulfate. *Analytical biochemistry*, 99:97-104.

Tijssen, P. et E. Kurstak. 1979b. Studies on the Structure of the Two Infectious Types of Densonucleosis Virus. *Intervirology*, 11:261-267.

Tijssen, P. et E. Kurstak. 1981. Biochemical, Biophysical and Biological Properties of Densonucleosis Virus (Parvovirus). III. Common Sequences of Structural Proteins. *Journal of Virology*, 37:17-23.

Tijssen, P., M. Arella et S. Kawase. 1990. Molecular Biology of Densonucleosis viruses. chap14. in *Handbook of Parvoviruses*, vol. II, ed. Peter Tijssen, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida., pp.283-291.

Tijssen, P. and M. Bergoin. 1995. Densonucleosis virus constitute an increasingly diversified subfamily among the parvoviruses. *Seminar in virology*, 6:347-355.

Tosser, G., M. Labbé, M. Brémont et J. Cohen. 1992. Expression of the major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particules by using recombinant baculoviruses. *Journal of Virology*, 66:5825-5831.

Tristram, D.A., R.C. Welliver, C.K. Mohar, D.A. Hogerman, S.W. Hildreth et P. Paradiso. 1993. Immunogenicity and Safety of Respiratory Syncytial Virus Vaccine in Seropositive Children 18-36 Months Old. *Journal of Infectious Diseases*, 167:191-5.

Trudel, M., F. Nadon, C. Séguin et H. Binz. 1991. Protection of BALB/c Mice from Respiratory Syncytial Virus Infection by Immunization with a Synthetic Peptide Derived from the G Glycoprotein. *Virology*, 185:749-757.

Truffaut, N., G. Berger, A. Niveleau, P. May, M. Bergoin et C. Vago. 1967. Recherche sur l'acide nucléique du virus de la densonucléose du lépidoptère *Galleria mellonella* L. *Archive fur gesamte, virusforsh* 21:469.

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

Urakawa, T., M. Ferguson, P.D. Minor, J. Cooper, M. Sullivan, J.W. Almond et D.H.L. Bishop. 1989. Synthesis of immunogenic, but non-infectious, poliovirus particles in insect cells by a baculovirus expression vector. *J. Gen. Virol.*, 70:1453-1463.

Vago C., G. Meynadier et J.-L. Duthoit. 1964. Étude d'un nouveau type de maladie à virus chez les lépidoptères. *Annales des Épiphyties* 15:475-479.

Vago, C., J. L. Duthoit et F. Delahaye. 1966a. Les lésions nucléaires de la virose à noyaux denses du Lépidoptère *Galleria mellonella*. *Archive fur Gesamte, Virusforsh* 18:344.

Vago C., J.M. Quiot et J. Luciani. 1966b. Infection of lepidopteran tissue culture with the purified virus of the denonucleus. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Série D*, 263:799-800.

Vernoux, J.P. et E. Kurstak. 1972. Étude biophysique de l'acide désoxyribonucléique du Virus de la Denonucléose (VDN). *Archiv fur die gesamte Virusforschung*, 39:190-195.

Walsh, E.E. and J. Hruska. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins : identification of the fusion protein. *J. Virol.*, 47:171-177.

Walsh EE, J.J. Schlesinger et M.W. Brandriss. 1984. Protection from respiratory syncytial virus infection in cotton rats by passive transfer of monoclonal antibodies. *Infect. Immun.*, 43:756-8.

Walsh, E.E., C.B. Hall, M. Briselli, M.W. Brandriss et J.J. Schlesinger. 1987. Immunization with glycoprotein subunits of respiratory syncytial virus to protect cotton rats against viral infection. *J. Infect. Dis.*, 155:1198-1204.

Wathen, M.W., T.J. Kakuk, R.J. Brideau, E.C. Hausknecht, S.L. Cole et R.M. Zaya. 1991. Vaccination of Cotton Rats with a Chimeric FG Glycoprotein of Human Respiratory Syncytial Virus Induces Minimal Pulmonary Pathology. *Journal of Infectious Diseases*, 163:477-482.

Weichert, W.S., John S.L. Parker, A.T.M. Wahid, Shwu-Fen Chang, Ellen Meir and Colin R. Parrish. 1998. Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and Its Role in Infection. *Virology* 250:106-117.

Wertz, G.W., P.L. Collins, Y. Huang, C. Gruber, S. Levine et L.A. Ball. 1985. Nucleotide sequence of the G protein gene of human respiratory syncytial virus reveals an unusual type of viral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4075-9.

Wu, H. et M. G. Rossmann. 1993. The Canine Parvovirus Empty Capsid Structure. *J. Mol. Biol.*, 233:231-244.

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