

À Marie-Claude

Benoît Hébert

Tropisme *in vitro* du parvovirus porcin

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophia Doctor (Ph.D.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation:

Max Bergoin, Université de Montpellier II
Ronald Magar, Agence canadienne d'inspection des aliments
Maximilien Arella, INRS — Institut Armand-Frappier
Peter Tijssen, INRS — Institut Armand-Frappier

INRS — Institut Armand-Frappier
Université du Québec
Mai 1999©

TABLE DES MATIÈRES

	Page
TABLE DES MATIÈRES	ii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Liste des abréviations	vi
Sommaire	vii
Préface	x
Introduction	1
SECTION I	
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
Avant-propos	11
1. Chapitre à être publié dans <i>Encyclopedia of Virology, 2nd ed.</i>	12
2. Relation structure-fonction des parvovirus	35
2.1 Interactions virus-cellule	36
2.1.1 Molécules d'attachement du virus	36
2.1.2 Étapes précoces de l'infection	37
2.2 Structure des parvovirus et rôle dans l'infection	38
2.2.1 Propriétés structurales des parvovirus	38
2.2.2 Implication de la capsid e dans l'infection	40
2.3 Conclusion	41
SECTION II	
CHAPITRE 1 — Séquençage de la souche Kresse du parvovirus porcin et analyse moléculaire des bases du tropisme <i>in vitro</i> . — <i>Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus: Identification of the Allotropic Determinant and Comparison with Those of NADL-2 and Field Isolates</i>	45
CHAPITRE 2 — Étapes précoces de l'infection <i>in vitro</i>	76
CHAPITRE 3 — Méthode de production et de purification massive du PPV	98
CHAPITRE 4 — Nouvelle méthode de mutagénèse dirigée	114

SECTION III	
DISCUSSION ET CONCLUSION	122
Avant-propos	123
Des changements génomiques simples sont responsables des principales propriétés qui distinguent les souches de parvovirus porcin — <i>Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties</i>	124
Résumé	125
Introduction	126
Pathogénicité et réponse immunitaire au PPV	126
Biologie moléculaire du PPV	127
Séquences non-codantes	128
Transcrits, épissage et protéines codées	129
Fonctions des protéines non-structurales	131
Tropisme et spectre d'hôte	132
La capsid est responsable du tropisme et le spectre d'hôte	132
Relation structure-fonction et comparaison à CPV	133
Structures conservées dans la capsid des parvovirus	133
Cartographie des résidus impliqués dans le tropisme	134
Rôle du déterminant allotropique	135
Diagnostic différentiel du PPV et prévention	135
Diagnostic différentiel	135
Vaccins contre le PPV	136
Conclusions	137
Relation structure-fonction: mise à jour des connaissances	159
REMERCIEMENTS	166
BIBLIOGRAPHIE	167
ANNEXES	175
ANNEXE 1 — Publications et communications scientifiques (1993-1999)	
ANNEXE 2 — Chapitre dans <i>Encyclopedia of Virology, 2nd ed.</i> (1999)	
ANNEXE 3 — Article publié dans <i>Journal of Virology</i>	
ANNEXE 4 — Article publié dans <i>Seminars in Virology</i>	

LISTE DES TABLEAUX

Revue de littérature		Page
Tableau 1.	Produits des transcrits viraux	30
Tableau 2.	Numéros d'accèsion GenBank pour les parvovirus de rongeurs, porcins, bovins et d'oiseaux aquatiques	31
Chapitre 2		
Tableau 1.	Détection de la production de PPV par hémagglutination	88
Tableau 2.	Localisation cellulaire des protéines de capsid de PPV	89
Chapitre 4		
Tableau 1.	Efficacité de mutagénèse en présence de la protéine du gène 32 du phage T4	120
Discussion		
Tableau 1.	Pathogénicité observée chez quatre isolats de PPV	146
Tableau 2.	Changements en acides aminés dans la séquence déduite de VP2 chez différents isolats de PPV	147

LISTE DES FIGURES

Introduction	
Figure 1.	Organisation génomique du PPV 7
Revue bibliographique	
Figure 1.	Propriétés et rôles des protéines NS de PPV 32
Figure 2.	Comparaison de l'épissage alternatif de PPV et MVM 33
Figure 3.	Structures de CPV et MVM 42
Chapitre 1	
Figure 1.	Séquence nucléotidique complète de la souche Kresse 66
Figure 2.	Séquence d'isolats cliniques de PPV 70
Figure 3.	Constructions des chimères de PPV 72
Figure 4.	Localisation de certains résidus critiques de PPV sur une projection de surface de CPV 74
Chapitre 2	
Figure 1.	Fluorescence nucléaire observée chez les cellules PT 90
Figure 2.	Distribution cellulaire de la souche Kresse et de la chimère N2xBK dans les cellules TV 92
Figure 3.	Distribution cellulaire de la chimère KxBN2 dans les cellules TV 94
Figure 4.	Infections des cellules TV par différentes souches ou chimères de PPV . 96
Chapitre 3	
Figure 1.	Résistance de PPV au Igepal CA-630 108
Figure 2.	Purification intermédiaire de PPV 110
Figure 3.	PPV purifié par gradient de CsCl 112
Discussion	
Figure 1.	Organisation génomique de PPV et épissage comparatif MVM / PPV . 149
Figure 2.	Construction de chimères de PPV 151
Figure 3.	Structure secondaire schématisée de CPV et localisation des résidus importants de PPV 153
Figure 4.	Localisation de certains résidus critiques de PPV sur une projection de surface de CPV 155
Figure 5.	Localisation des résidus qui diffèrent entre Kresse et NADL-2 projetés sur la structure secondaire de CPV 157

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

ADN / DNA:	Acide désoxyribonucléique
ADV:	Aleutian Mink Disease parvovirus
CPV:	Parvovirus canin
CRFK:	Lignée cellulaire de reins félines (Crandell Feline Kidney)
Da / kDa:	Dalton / Kilo Dalton
DICT ₅₀ / TCID ₅₀ :	Dose infectieuse en culture de tissu provoquant 50% d'effet cytopathique (Tissue culture infectious dose)
GmDENV:	<i>Galleria mellonella</i> densovirus
HA:	Hémagglutination
IF:	Immunofluorescence
MDCK:	Lignée cellulaire de reins canins (Madin-Darby Canine Kidney)
MDKB:	Lignée cellulaire de reins bovins (Madin-Darby Bovine Kidney)
MOI:	Multiplicité d'infection
MPV:	Murine Parvovirus
MVM:	Minute virus of mice
p.i. / h.p.i.:	Post-infection / Heures post-infection
pb(bp) / kpb(kbp):	paire de bases (base pair) / Kilo paire de bases (kilo base pair)
PFT:	Lignée cellulaire de trompes de Fallope porcines
PK15:	Lignée cellulaire de reins porcins (Porcine Kidney)
PPV:	Parvovirus porcin
PT:	Lignée cellulaire de testicules de porcs (sous-clone de cellules ST)
PTA:	Acide phosphotungstique
TV:	Culture primaire de testicules de veaux

SOMMAIRE

Les virus de la famille des *Parvoviridae* sont caractérisés par leur génome d'ADN simple brin, généralement de polarité négative, encapsidé dans un assemblage protéique icosaédral d'environ 26nm de diamètre. Malgré leur petite taille et leur génome limité d'environ 5 kb, l'organisation génomique ainsi que la réplication des parvovirus sont néanmoins complexes. De plus, la majorité des membres de cette famille sont associés à plusieurs pathologies chez diverses espèces.

Chez le porc, les infections parvovirales causent des problèmes liés à la reproduction. Des travaux antérieurs ont démontré l'existence de plusieurs souches dont la virulence varie considérablement. Les présents travaux ont pour objectif de caractériser, au niveau moléculaire, les différences pouvant être responsables de cette virulence accrue chez certaines souches.

Par analogie avec d'autres parvovirus, notamment le parvovirus canin où la capsid est responsable du spectre d'hôte félin-canin, notre hypothèse nous permettait d'entrevoir que la capsid du penchant porcin joue probablement un rôle important dans le tropisme cellulaire du virus et finalement comme facteur modulant la virulence par l'interaction avec les cellules cibles. Ce tropisme pourrait déterminer le type de pathologie associé à l'infection.

Nos travaux ont tout d'abord été centrés sur le séquençage complet de la souche Kresse du parvovirus porcin et l'analyse de cette séquence. Nous avons démontré que la souche vaccinale NADL-2 et la souche pathogénique Kresse ne diffèrent que par 5 acides aminés dans le gène de la capsid. Outre ces différences, le génome viral entier ne comporte que de différences non codantes. Une autre différence pour laquelle aucune fonction n'est encore connue est la présence d'une répétition de 127 nucléotides en aval de la région codante du gène de la capsid chez la souche vaccinale. Cette séquence répétée n'est présente qu'en un exemplaire chez la souche Kresse tout comme chez les autres souches pathogéniques

partiellement séquencées. De telles répétitions sont présentes chez d'autres parvovirus mais aucune fonction ne leur est encore associée.

Afin de comprendre l'importance de la capsidie dans le tropisme viral, étant donné que nos résultats suggèrent que celle-ci est la seule composante du virus ayant, a priori, un impact possible lors de l'infection, nous devons établir un système *in vitro* permettant de distinguer les souches non-pathogéniques des souches pathogéniques. Un criblage de plusieurs lignées cellulaires ne nous a pas permis de distinguer les souches NADL-2 et Kresse par un test d'infectivité. Par contre, nous avons identifié qu'une culture primaire de testicules de veaux (TV) utilisée pour la détection et l'amplification de virus appartenant à d'autres familles était également permissive au parvovirus porcine dans certains cas. Nous avons alors démontré que seulement les souches apparentées à la souche vaccinale NADL-2 pouvaient se répliquer sur ces cellules contrairement aux souches virulentes apparentées à la souche Kresse. Ayant établi pour la première fois un système *in vitro* permettant de déterminer le phénotype des souches de parvovirus porcine, nous devons maintenant déterminer si effectivement la capsidie était le facteur déterminant du tropisme observé.

Seule l'obtention des clones infectieux des souches NADL-2 et Kresse nous a permis de réaliser ces travaux. Nous avons procédé à l'échange d'un fragment génomique (entre NADL-2 et Kresse) codant pour trois des cinq résidus qui diffèrent entre NADL-2 et Kresse. Bien que ces virus ne soient pas différents en apparence lorsque cultivés sur des cellules permissives PT (testicules de porcs), la croissance des chimères sur les cultures primaires TV était apparentée non pas à la majeure partie du génome viral mais dépendait seulement du fragment échangé.

Ces résultats constituent la première preuve que le tropisme cellulaire du parvovirus porcine dépend, du moins *in vitro*, exclusivement de la capsidie. De plus, par analogie au parvovirus canin dont la structure tridimensionnelle est connue, deux des trois résidus échangés se retrouvent probablement dans des régions externes des boucles de surface de la capsidie.

Nous avons poursuivi l'étude de l'infection *in vitro* par immunofluorescence dans diverses lignées cellulaires en combinaison avec les différentes souches ou chimères utilisées pour les autres travaux. Nous avons étudié morphologiquement la distribution des particules virales lors des étapes précoces de l'infection. Nos résultats montrent que la distribution des particules tôt dans l'infection ne concorde pas toujours avec le phénotype de restriction attribué à ces cellules.

Étant donné que notre modèle *in vitro* permet de comprendre comment le tropisme viral peut être régulé, nous avons eu comme objectif de déterminer la structure tridimensionnelle du parvovirus porcin. Afin de déterminer la structure atomique par diffraction de rayons-X, la première étape consistait à mettre au point des méthodes de purification de virus à grande échelle. La partie suivante de cette thèse fait donc état des méthodes développées afin de produire et de purifier le parvovirus porcin pour la cristallographie.

Finalement, un dernier chapitre porte sur une nouvelle méthode de mutagenèse dirigée développée en réponse à des difficultés techniques rencontrées avec les clones infectieux. Nous désirions déterminer les paramètres structuraux requis pour le tropisme, c'est pourquoi nous devions effectuer la mutagenèse des différents résidus (seuls ou en combinaison) responsables du tropisme observé.

En résumé, les travaux présentés dans cet ouvrage font état des premiers résultats démontrant l'importance de la capsid du parvovirus porcin dans le tropisme cellulaire ainsi que d'une étude préliminaire des mécanismes qui en sont responsables. De plus, les méthodes développées afin de permettre la purification à grande échelle sont également présentées.

PRÉFACE

Le format de cette thèse exige de faire état de la contribution des différents auteurs lors de publication de manuscrits. J'en profiterai également pour faire état des collaborations et des travaux conjoints qui font partie intégrante de tout travail scientifique.

La revue bibliographique présentée ici est principalement sous forme de revue de questions, celle-ci publiée à l'été 1999. Le premier chapitre plus général portant sur divers parvovirus a été rédigé au printemps 1998.

Diverses personnes ont collaboré à cet ouvrage (*Encyclopedia of Virology*, 2ième édition) dont la version finale a été discutée en groupe. La liste des auteurs apparaît plus bas dans le même ordre que sur la publication.

Peter Tijssen: supervision générale, uniformité du manuscrit

Mohamed Laakel: parvovirus murins

Zoltan Zadori: parvovirus d'oiseaux aquatiques

Benoît Hébert: parvovirus porcine et parvovirus bovine; introduction, taxonomie, morphologie, tropisme, figures et tableaux, uniformité du manuscrit

Le chapitre sur la caractérisation de la souche Kresse, la construction de chimères et les études *in vitro* sur le tropisme (*J. Virology*, 1996) est la partie majeure de cette thèse, tant au plan du contenu scientifique et de son impact que du travail requis pour y arriver. Étant donné que ces travaux ont été réalisés par plus d'une personne, comme c'est normalement le cas en recherche, il est requis de décrire ici plus en détail la contribution de chacun à la réalisation de ces travaux.

Ces travaux ont débuté en 1992, quelques mois avant mon arrivée dans le laboratoire du professeur Tijssen. Suite à la caractérisation de la souche NADL-2 et des résultats de

séquençage partiel d'isolats de PPV provenant du Québec, des différences ont été identifiées principalement dans le gène codant pour la capsid. A mon arrivée au laboratoire, le docteur Bergeron entreprenait le clonage de la souche Kresse afin d'obtenir un clone infectieux. C'est ce même clone infectieux que nous avons séquencé au cours de l'année suivante. Parallèlement, nous avons séquencé partiellement d'autres isolats de champ. Par la suite, nous avons entrepris de construire des chimères. Ces travaux ont été effectués autant par Jean Bergeron et moi-même alors qu'un problème majeur est survenu dans l'échange du fragment *Bgl* II qui était malheureusement ré-inséré constamment dans la mauvaise orientation. Une fois ces constructions effectuées, j'ai été responsable de produire les virus recombinants par transfection et de faire les études *in vitro*. Nous n'avions toujours pas de système cellulaire permettant de différencier les souches, les résultats d'un groupe compétiteur ne pouvant être reproduits. Après quelques mois de travail, mes résultats ont démontré que des cellules provenant d'une culture primaire de testicules de veaux utilisée pour le diagnostic *in vitro* au Service de diagnostic du MAPAQ permettaient de cultiver la souche vaccinale du parvovirus porcine alors que les isolats virulents ne pouvaient y être cultivés. Ces cellules ont été utilisées pour étudier *in vitro* le tropisme des virus chimériques.

Ces résultats, présentés pour la première fois à l'atelier portant sur les parvovirus à Montpellier en 1995, ont été soulignés pour leur originalité et leur importance lors de la session de clôture du congrès.

La liste des auteurs a été déterminée en fonction de la séniorité des auteurs dans ce projet tout en mentionnant l'apport égal de J.B. et B.H. dans le manuscrit:

- Jean Bergeron: coauteur principal; clone infectieux souche Kresse et séquençage, chimères.
- Benoît Hébert: coauteur principal; séquençage, chimères, test cellulaire *in vitro*, rédaction de la publication; figures.
- Peter Tijssen: supervision des travaux et de la rédaction de la publication.

Le chapitre portant sur la purification du parvovirus porcin provient de travaux effectués au cours des deux dernières années de mes travaux de doctorat. Cette étape est déterminante dans l'obtention de cristaux de virus qui permettront éventuellement de déterminer sa structure. J'ai effectué ces travaux entièrement, sous la supervision de mon directeur de recherche.

Afin de mieux comprendre l'impact des différences responsables du tropisme *in vitro*, nous avons entrepris des travaux de mutagenèse dirigée. Ces travaux ont été marqués par des problèmes techniques à cause de la présence de structures secondaires importantes dans les régions 5' et 3' qui sont déterminantes pour la réplication virale. Étant donné l'absence de sites permettant le sous-clonage du fragment d'intérêt, j'ai dû trouver une solution à ce problème. Ces travaux supervisés par mon directeur de recherche présentent des idées originales et des travaux que j'ai effectués dans le cadre d'une publication soumise à *BioTechniques*.

La revue de question sur le parvovirus porcin publiée dans un numéro spécial de *Seminars in Virology* (1995) portant sur les parvovirus a été supervisée par mon directeur de recherche, Peter Tijssen. La section portant sur le diagnostic du parvovirus porcin et vaccins parvoviraux a été rédigée par Roger Dubuc, la section portant sur la biologie moléculaire du parvovirus porcin a été rédigée par Jean Bergeron et moi-même, alors que j'ai également rédigé la section sur le tropisme et le spectre d'hôte en plus de faire les figures et l'assemblage du manuscrit final avec mon directeur de recherche.

Finalement, plusieurs travaux n'ont pas été présentés dans le cadre de cette thèse. En plus de ma participation à plusieurs projets du laboratoire, un an de travail a été consacré à l'expression et la purification de protéines recombinantes chez *E. coli*. L'immunisation des protéines non-structurales du parvovirus porcin chez des lapins s'est avérée inefficace.

Le dernier volet expérimental sera éventuellement publié en partie. Ces travaux concernent la mise au point de méthodes de détection du parvovirus porcin par PCR dans le cadre d'un contrat de recherche entre mon directeur de recherche et la compagnie IPSEN (U.K.).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La simplicité apparente des parvovirus provient de leur diamètre réduit ainsi que de leur génome de petite taille. Du latin *parvus* signifiant “petit”, la famille des *Parvoviridae* est constituée de virus de 26nm de diamètre moyen dont le génome est composé d’ADN simple brin, généralement à polarité négative, dont les extrémités adoptent des structures secondaires cruciformes ou en épingles à cheveux.

La complexité des parvovirus repose sur leur organisation génomique chevauchante ainsi que sur l’épissage alternatif afin de potentialiser l’utilisation du génome. Dans quelques cas chez les densovirus (parvovirus d’insectes), les cadres de lecture chevauchants sont mêmes organisés dans des orientations inverses. En plus de maximiser l’utilisation du génome, la plupart des protéines sont souvent multifonctionnelles. Il est donc nécessaire pour le virus d’avoir une régulation temporelle d’expression stricte afin de maximiser l’utilisation des produits de ses gènes. Malgré leur grande capacité lytique, les parvovirus dépendent néanmoins initialement de la cellule cible afin de compléter le cycle viral d’où la nécessité pour les parvovirus d’infecter des cellules durant la phase de synthèse d’ADN (phase S) de l’interphase cellulaire.

Les parvovirus sont donc ciblés vers des cellules ayant une activité mitotique intense comme les cellules souches sanguines, les cellules hépatiques ou encore la couche basale du derme. Dans le cas du parvovirus porcin, les tissus fœtaux sont des cibles de choix car les cellules embryonnaires, étant dans un stade précoce de développement, ne possèdent pas de phase G_1 et G_2 du cycle de division cellulaire, mais seulement une alternance de courtes phases M (division) et S (réplication de l’ADN). L’importance économique du parvovirus porcin est principalement associé à son pouvoir pathogène chez les embryons ou les animaux de bas âge.

Les travaux présentés dans le cadre de cette thèse de doctorat concernent un agent pathogène important du cheptel porcin, le parvovirus porcin. Au Québec, plusieurs éleveurs sont aux prises avec cet agent pathogène responsable du syndrome SMEDI (*Stillbirth, Mummification,*

Embryonic Death, Infertility) qui cause une réduction des portées. Malgré l'utilisation de vaccins, nos résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir apparition de nouvelles souches. De plus, il est presque impossible de se débarrasser des particules infectieuses répandues dans les porcheries, principalement à cause de la très grande stabilité du virus.

Dans le cas du parvovirus porcin, sauf pour les souches très pathogènes, les problèmes reproducteurs retrouvés naturellement se limitent aux infections dans la phase non-immunocompétente des fœtus. Comme nous le verrons, l'apparition de nouvelles souches complique la situation.

Malgré leur spectre d'hôte limité, les différents parvovirus soulèvent un problème important en terme d'émergence de nouvelles souches virales ayant des propriétés différentes. L'adaptation du parvovirus de la panleucopénie féline (feline panleukopenia virus; FPV) lui permettant de franchir la barrière d'espèce chez le chien a en effet causé des ravages à la fin des années 1970. Il existe également chez un parvovirus murin (MVM) des souches ayant des propriétés différentes reliées au tropisme des cellules cibles.

La diversité croissante des souches virales cause un problème sérieux principalement à cause de l'identification de cas où la pathologie observée n'avait jamais été associée au parvovirus porcin préalablement. Le premier cas, décrit en 1985, fait état de dermatites sévères et d'autres symptômes, dont des entérites, associés au parvovirus porcin. Bien qu'initialement un de ces isolats (Kresse, nommé en hommage au premier auteur de cet article) ne soit pas reconnu comme une souche très virulente, elle l'a été plus tard par le groupe de Molitor. Ces travaux ont démontré que les problèmes reproducteurs associés à cette souche étaient plus sérieux que dans le cas des souches pathogéniques dites "classiques". En effet, lors de la gestation, le porc fœtal est normalement immunocompétent à partir de 70 à 80 jours et est alors résistant aux infections par le PPV. La souche Kresse parvient néanmoins à infecter et à causer le syndrome SMEDI après cette période d'immunocompétence.

Afin de développer des vaccins également efficaces contre les souches émergentes, une caractérisation moléculaire des souches de PPV était nécessaire. Nos travaux présentés ici sont donc centrés sur l'analyse du génome de la souche Kresse du PPV ainsi que sur des travaux permettant de comprendre de quelle façon les souches diffèrent entre-elles.

Les travaux des groupes de Colin Parrish (Cornell University) et Peter Tattersall (Yale) ont démontré que les différences reliées au tropisme observées entre les diverses souches d'un même sous-groupe (e.g., CPV, MVM) sont principalement causées par un nombre restreint de variations au niveau des protéines de la capsid du virus. Étant donné les différences de virulence observées dans le cas du PPV, il est possible qu'il en soit de même au niveau de son tropisme cellulaire.

En effet, suite au séquençage partiel de nombreux isolats de PPV et au séquençage complet de deux souches de PPV, nous avons suggéré que des différences minimales sont associées aux diverses pathologies observées. La souche qualifiée de vaccinale (NADL-2) ne diffère que par cinq acides aminés au niveau de la capsid virale avec la souche virulente Kresse. De plus, en corrélant les anamnèses des différents cas cliniques, les séquences des gènes de capsides de plusieurs isolats et la virulence connue de certaines souches, nous avons proposé qu'il existe quatre grands groupes de parvovirus porcins: non-pathogénique, pathogénique, pathogénique et causant des dermatites, et les parvovirus associés aux entérites.

La présence d'un déterminant allotropique chez le parvovirus porcins n'avait encore jamais été démontré. Afin de prouver l'importance de la capsid dans le tropisme cellulaire, nous avons entrepris de construire des virus chimériques à l'aide des clones infectieux et de les caractériser.

Pour la plupart des parvovirus, la permissivité de lignées cellulaires continues varie selon les souches (ou isolats) en plus de varier selon l'espèce virale (CPV vs MVM vs PPV, etc.). Afin de pouvoir différencier les souches, nous devons développer un système cellulaire où il serait possible de catégoriser les souches selon leur tropisme cellulaire.

L'utilisation de cellules provenant de cultures de cellules primaires de testicules de veaux (TV) nous a permis de mettre au point un système *in vitro* où la permissivité différentielle des souches pouvait être exploitée afin de comprendre le rôle de la capsid. En effet, ce système cellulaire nous a permis d'établir le rôle de la capsid grâce aux virus chimériques. Les chimères où trois résidus sur cinq différents ont été échangés se comportent comme les souches d'où proviennent ces résidus. Les cellules TV ne sont pas permissives à la souche pathogénique Kresse alors qu'elles le sont pour la souche NADL-2. Dans le cas des chimères, la souche dont la majeure partie du génome provient de la souche Kresse mais où l'on retrouve une partie du gène de la capsid de la souche NADL-2 peut maintenant se répliquer sur ces cellules, et vice-versa.

Nos travaux présentés ici démontrent donc le rôle de la capsid dans le tropisme cellulaire ainsi que l'importance de la capsid dans le cycle viral. Bien qu'encore hypothétiques à ce stade, nos résultats indiquent qu'en l'absence de différences codantes ailleurs dans le génome, les différences au niveau de la capsid doivent être reliées à la pathologie observée directement via le cycle infectieux ou indirectement via la réponse immunitaire.

Ces travaux s'inscrivent dans une problématique centrée sur l'étude structure-fonction des parvovirus. En effet, le groupe du professeur Tijssen collabore avec, notamment, les professeurs Michael Rossmann (Purdue University), Colin Parrish (Cornell University), Gilles Fédière (Institut de recherche pour le développement, Paris) et Max Bergoin (Université de Montpellier II) afin d'élucider les mécanismes responsables du tropisme chez le PPV et les densovirus d'insectes. Afin d'élucider de tels mécanismes, la structure du PPV doit être déterminée. Une partie des travaux présentés ici concernent la mise au point de méthodes de purification du virus à grande échelle afin d'obtenir des quantités suffisantes pour la cristallisation.

Durant la progression de ces travaux, le PPV a gagné en importance à cause de son potentiel pathogénique lors de xénogreffes porcines. À cause de la nature du tropisme et du spectre d'hôte des parvovirus, l'importance du PPV se situe au niveau du potentiel d'élargissement

du spectre d'hôte dans un contexte où le virus parviendrait à se propager dans un organisme étranger suite à une réplication efficace dans le tissu permissif greffé. L'accumulation de mutations pourrait alors être bénéfique pour le virus mais tragique pour l'hôte.

Les travaux de doctorat effectués dans la poursuite de cet objectif seront présentés sous forme d'articles scientifiques publiés ou non. Ce format remplace le format traditionnel où les sections sont présentées successivement. Un premier article de fond a déjà été publié dans *Journal of Virology* et un deuxième est en préparation. La section de purification du virus est néanmoins présentée sous forme d'article car ces résultats feront partie intégrante de la publication sur la structure du PPV d'ici la fin de 1999.

Cette thèse comporte deux parties distinctes soit premièrement, la revue de littérature et deuxièmement, les publications. Dans le cas de la revue de littérature, étant donné le nombre des revues publiées quasi-annuellement dans le domaine, il est inutile de répéter les mêmes informations. Par contre, le but de cette revue de littérature est de bien définir le cadre expérimental. C'est pourquoi j'ai choisi d'inclure une publication plus générale, issue de la deuxième édition du *Encyclopedia of Virology* (1999).

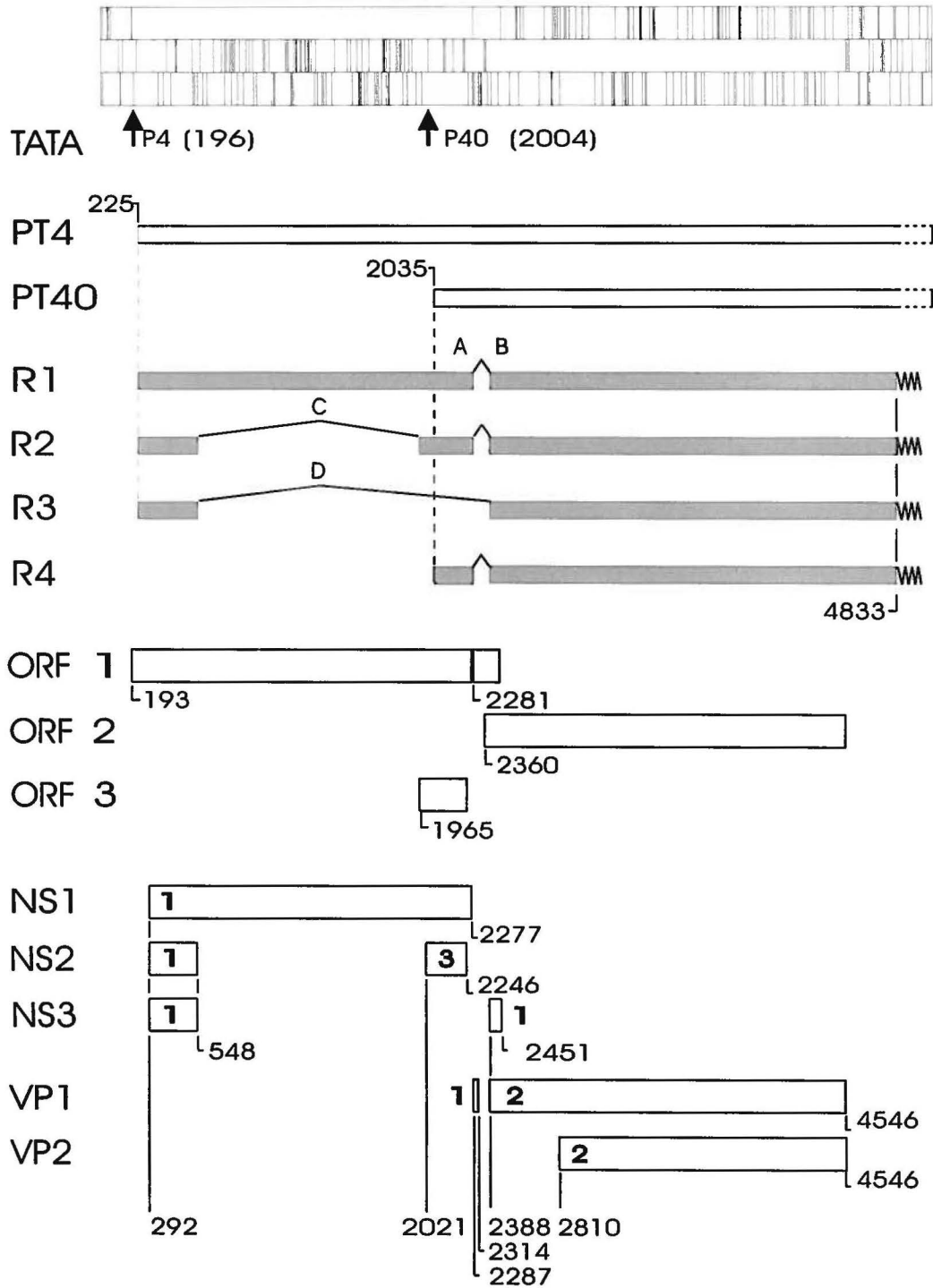
Cette revue bibliographique ne serait complète, à mon avis, sans deux éléments. Premièrement, le lecteur est référé à la figure 1 qui décrit l'organisation génomique du PPV, travaux effectués dans le laboratoire du Dr. Tijssen dans le cadre des travaux de doctorat de Jean Bergeron (Bergeron *et al.*, 1993). Deuxièmement, une discussion ciblée sur le parvovirus canin, le plus proche parent du PPV sera présentée. De plus, quelques généralités structurales des parvovirus y seront discutées, principalement en ce qui concerne les structures de CPV et MVM.

La relation structurale entre PPV et CPV fera l'objet de discussion à la fin de la thèse alors que certains résultats seront repris et discutés en fonction de résultats plus récents. Le corps de la discussion est composé d'un article publié dans *Seminars in Virology* portant sur le PPV.

Figure 1. Organisation génomique du PPV

À partir du génome de polarité négative sont produits deux transcrits primaires, PT4 et PT40. Ceux-ci sont épissés et retrouvés sous sept formes: R1A, R1B, R2A, R2B, R3, R4A et R4B. La protéine non-structurale NS1 est produite à partir de la forme R1, NS2 de R2, NS3 de R3 et les protéines de capsid VP1 et VP2 à partir de R4A et R4B respectivement.

Brin "+"



SECTION I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Avant-propos

Contrairement au format traditionnel, la thèse par article se veut succincte. Dans le cas présent, deux revues de questions ont déjà été publiées. La première, la plus récente et la plus générale, fait état de généralités des parvovirus murins, porcins, d'oiseaux aquatiques et bovins alors que la deuxième est ciblée sur le parvovirus porcine et est incluse dans la discussion.

La deuxième partie de la revue porte principalement sur les aspects structure-fonction des parvovirus. Le parvovirus canin sera discuté plus en détail dans cette dernière section puisqu'il existe une importante similitude entre PPV et CPV. Ce dernier servira également de base comparative à plusieurs occasions.

Première partie -- Généralités sur les parvovirus

Chapitre publié en 1999 dans *Encyclopedia of Virology, 2nd ed.* portant sur les parvovirus murins, porcins, bovins et d'oiseaux aquatiques.

Ce manuscrit écrit au début de 1998 couvre les aspects généraux des parvovirus cités dans le titre. De par son format, il permet de comparer certains aspects de ces parvovirus. Étant donné la proximité évolutive des parvovirus canins et porcins, ils seront comparés à la section suivant celle-ci.

Encyclopedia of Virology – 2nd Edition

Parvoviruses of Rodents, Pigs, Cattle and Waterfowl

by

Peter Tijssen, Mohamed Laakel, Zoltán Zádori and Benoît Hébert

Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Laval, Canada H7V 1B7

Keywords

parvovirus, pig, mouse, rat, waterfowl, duck, bovine, tropism, host range

Introduction

Parvoviruses are among the smallest and sturdiest viruses known and the only viruses with linear single-stranded (ss) DNA genomes. Due to their limited coding capacity and inability to induce cellular replication, the infection by parvoviruses requires rapidly dividing cells which provide proteins necessary for the infection. Consequently, their pathogenicity is restricted to permissive cells of that nature such as fetal tissue, epithelium and transformed cells.

History

Rat virus (RV) was first isolated from 1959, when Kilham and Olivier were searching for a rat papovavirus in rat embryo cell cultures followed rapidly by the isolation of H-1 virus from cell filtrates. The minute virus of mice (MVM) was isolated in 1966 by Crawford from laboratory stocks of mouse adenovirus. More recently, mouse parvovirus (MPV) was identified during the mid-eighties due to differences in hemagglutinating properties between MVM and this new agent.

Bovine parvovirus (BPV) was isolated by Abinanti and Warfield in 1961. Originally, this virus was known by its acronym HADEN ('hemadsorbing enteric') which indicated the ability of infected cells to adsorb erythrocytes and the isolation of the virus from gastrointestinal tracts. BPV is endemic and is mainly associated with enteritis and respiratory infections in association with other agents.

Porcine parvovirus (PPV) is a major disease-causing agent in pigs. Although the major syndrome known as SMEDI (stillbirths, mummification, embryonic death and infertility) was described by Howard Dunne and co-workers in the mid-60s, PPV was isolated and differentiated from the enterovirus agents for the first time in 1975. PPV strains have been isolated from different sources and have also been associated with other syndromes such as respiratory infections, dermatitis, rhinitis and enteritis.

The Goose parvovirus (GPV) was first isolated among the waterfowl parvoviruses (WFPs). GPV causes a highly contagious and fatal disease of goslings and muscovy ducklings which emerged in the middle of the 1960s and was known under different names: goose influenza (Hungary), infectious myocarditis (Italy), hepatonephritis ascites (France), viral enteritis (former USSR), goose plague (Netherlands) and goose hepatitis (Germany). The working group of the World Poultry Scientific Association named it Derzsy's Disease after the late Domokos Derzsy. In 1971, Schettler isolated the causative agent and showed that it is a parvovirus.

Muscovy duck parvovirus (MDPV) and GPV are closely related to each other. MDPV was isolated in France in the late eighties from an epidemic which was 80 % fatal among the young muscovy ducks. The third waterfowl parvovirus emerged in Taiwan in 1989 during an epizootic duckling disease. The disease affected all breeds of ducks including their hybrids but the geese were spared. The epizootic was diagnosed as a co-outbreak of duck parvovirus (DPV) infection and duck viral hepatitis virus. Inoculating the DPV alone in all duck breeds reproduced the high mortality and symptoms of the disease.

Taxonomy and Classification

All known viruses with a linear ssDNA genome belong to the *Parvoviridae* family which is further divided into two subfamilies: the *Parvovirinae* of vertebrates and the *Densovirinae* of invertebrates. The *Parvovirinae* subfamily is comprised of three genera: (1) *Parvovirus*, (2) *Erythrovirus* and (3) *Dependovirus*. This outdated classification needs to be revised since it is mainly based on phenotypic properties. Phylogenetic analysis reveals different associations which are more biologically relevant in terms of genome organization. For example, while *Parvovirus* members are autonomous, helper viruses can increase their replication substantially. On the other hand, *Dependovirus* members can sometimes replicate autonomously. The parvoviruses discussed here are, in the current taxonomy, all classified in the parvovirus genus. Although the porcine and the rodent parvoviruses are very similar, BPV is quite different, so are the WFPs. The WFPs are genetically closely related to viruses in the dependovirus genus (e.g. AAV) and not to others in the parvovirus genus. Comparison of

non-structural and structural proteins of the WFPs suggests that the AAVs and the WFPs may have evolved from a common ancestral virus.

Properties of the Virion

Parvoviruses are among the most stable viruses. Non-purified virus has been shown to withstand 2h at 80°C, although purified viruses are not as stable (e.g. resistant for 1 h at 56°C). Most parvoviruses are also stable within the pH range 2-11. Sonication (without heating) does not affect the virus but it is sensitive to UV irradiation. Resistance to organic solvents, such as butanol and chloroform, and enzymes, such as DNase, RNase and various proteases has been noted. Capsids can also withstand many detergents, although they are dissociated in sodium dodecylsulfate (SDS) solutions. Their compact arrangement of the isometric nonenveloped particles is responsible for these properties.

Parvoviruses capsids possess icosahedral symmetry with an approximate external radius of 140 Å and a buoyant density in CsCl of about 1.40 g/ml (full particles) or 1.30 g/ml (empty particles). The sedimentation coefficient is approximately 120S for full particles and 60S for empty particles. The capsid contains three to four different proteins (Table 1) and a total of 60 protein molecules per virion. The 60 kD structural proteins found in full, mature particles of BPV, MVM and PPV are proteolytic cleavage products from 64-62 kD proteins. The major structural proteins are produced by a nested set of genes and have identical C-terminal sequences. While the structural proteins are not glycosylated, they have been shown to be the target for phosphorylation, at least in MVM, and this form appears to be involved in morphogenesis.

The structure of MVM has been determined in 1997 while structures of empty capsids of PPV, GPV and MDPV are being elucidated. The MVM structure is closely related to the CPV structure and contains an internal anti-parallel β -barrel and external three-fold spikes. Differences are mostly found on the surface in the two-fold depression where a protrusion is located on a dimple-like structure.

Viral Genome and Molecular Biology of Replication

The rodent and porcine parvoviruses encapsidate virtually only the negative-strand (complementary to mRNA) although about 1% of viral DNA has positive polarity. Genome lengths reported for these viruses are 5085/5149 nu for MVMi/MVMp, 5176 nu for H-1, 5517 nu for BPV, 5106 for GPV, 5132 for MDPV and 5075/4948 nu for PPV NADL2/Kresse (GenBank accession numbers are listed in Table 2). The genomic organizations are almost identical for these viruses. Interestingly, the nonviremic strains MVMp and PPV-NADL2 differ from the viremic strains by a repeated sequence at the 5' end of the viral genome.

The viral strand is, concomitant with synthesis, excised from the replicative form and encapsidated from the 5' end in (pro)virions (1.44 g/ml particles containing only VPI and VP2). The VP2 are partially converted by proteolysis to VP3 which leads to a decrease in the density to 1.40 g/ml ('mature' particles). NS1 is still attached to the viral genome to the outside of the capsid and is often removed just before or during infection.

Approximately 10% of BPV virions contain the 5517 nucleotide positive-strand DNA molecule, whereas the remainder contains negative-strand DNA. The genome hairpin termini differ from those of the rodent and porcine viruses in several respects. They lack any sequence homology and are 150 (left) and 121 (right) nucleotides long. The left-hand hairpin (3' end of negative-strand) has both flip and flop orientations, with a 10-fold excess of flip, whereas the right-hand hairpin contains both orientations in equal amounts.

The WFPs encapsidate the opposite polarity strands in equal amounts. The genome lengths of the GPV and MDPV are 5106 and 5132 nucleotides, each including long ITRs of 444 and 457 nucleotides respectively. The coding regions of MDPV and GPV do not contain insertions or deletions when compared to each other but differences in length can be attributed to short deletions in GPV's ITRs and to a 5' nucleotide deletion in the GPV genome shortly after the first stop codon of the capsid gene.

Transcription and Translation

Porcine and rodent parvoviruses have two genes, each coding for several products (Table 1). Their genomic organizations are almost identical. The genes are transcribed from two promoters (P4 & P38 for MVM; P4 & P40 for PPV) and the transcripts coterminate near the 5' end of the negative-strand. The P4 transcripts code for the nonstructural proteins (left half of the transcripts) and P38/P40 codes for the structural proteins. A peculiarity of the transcripts originating from P4 is that both the nonspliced and the spliced transcripts are translated (NS1 and NS2/NS3 respectively). While MVM has different forms of NS2, we observed a third transcript of a potential nonstructural protein for PPV, NS3, which has the same N-terminal domain as NS1 and NS2 but the reading frame of the C-terminal domain overlaps the ORFs of the structural proteins. The role of this protein is unknown. The N-terminal sequences of NS1 and NS2/NS3 are identical whereas the C-terminal sequences differ (overlapping ORFs). The intron removed to generate the NS2/NS3 transcript contains an NTPase (probably ATPase), a trans-activation response element, which upregulates expression from P4, and the P38/P40 promoter elements (Figure 1).

Splicing in parvoviruses is governed often using non-consensus donor or acceptor sequences. The relative abundance of the spliced transcript (steady-state ratio) has been shown, for MVM, to be dependent on sequences located within the large and small introns. Sequences within the NS2-specific exon itself are required for its inclusion in the mature transcript. As described for MVM, the efficient excision of the upstream large intron (within NS1) from P4-generated mRNAs depends on at least the initial presence of sequences within the downstream small intron

The start codon for VPI of the various rodent and porcine parvoviruses is located almost immediately after the stop codons of NS1/NS2. There are small introns at about 40 map units in all P4 transcripts. The donor sites for these small introns are just upstream or just downstream of the VPI start codon. When the upstream site is used, the start codon is removed and another start codon, almost 800 nucleotides downstream, is used resulting in VP2 (Figure 2).

The strategy used by BPV is different: for example, there are three major open reading frames (ORFs) (left, mid and right) instead of two. Analysis of the genome suggests three promoters, P4, P13 and P38. Again, P38 is responsible for the production of capsid proteins. Unlike the rodent and porcine parvoviruses, BPV codes for two large proteins and two smaller proteins. BPV shares with all autonomous parvoviruses a glycine-rich region (a stretch of 10-20 G) near the proteolytic cleavage site to generate the smallest capsid protein. This G-run could distort the α -helix structure and make it susceptible to proteolysis. Three BPV NS proteins have been detected (Table 1). The 83 and 75 kD proteins share with NS1 of PPV and rodent parvoviruses the property that they are expressed before the capsid proteins [8 vs 14h postinfection (p.i.)]. The NS1A and NS1B proteins of BPV may differ in the degree of phosphorylation, although both products can be detected after *in vitro* translation (suggesting primary translation products).

Gel retardation assays demonstrated that both capsid and NS proteins bind to the left end of the BPV genome and may play different roles in replication and packaging. The right end of the genome does not compete with the left end for these proteins. Cellular proteins, particularly during S-phase, also form a specific complex with the DNA.

Recent work on the genetic analysis of WFP has demonstrated an organization similar to that of the AAVs and, similarly, three promoters, P9, P19 and P41 have been identified. Again, P41 is responsible for the production of capsid proteins while P9 and P19 are the transcriptional activators for the REP protein. It is interesting to note that while VP1 and VP3 are initiated from conventional AUG codons, VP2 is initiated from an ACG codon. Alternative splicing regulates the synthesis of the various capsid proteins as VP1 is bracketed between two alternative acceptor splicing sites. VP1 is synthesized when the upstream acceptor is used whereas VP2 and VP3 are made when splicing occurs at the downstream acceptor site.

Viral Morphogenesis

Parvoviruses lack the ability of most other DNA viruses to stimulate resting cells to DNA synthesis. The first steps during infection, i.e. absorption, penetration and uncoating in the cell, do not require viral functions but normal cellular processes. Mature (containing VP1, 2 and 3) and immature particles (VP1 and 2) compete equally well for receptors. Internalization through coated pits has been observed. It has been postulated that the virus is transported actively to the nucleus by the signal carried on the first ten amino acids of VP1. Uncoated DNA is not observed in the cytoplasm. The S-phase-dependent event appears to be the synthesis of the complementary strand from the 3' end of the negative-strand. The resulting duplex can then serve as a template for transcription and expression. It should be noted that for MVMi and MVMp, in A9 cells, the steps up to transcription are equally efficient but that transcription and translation differ significantly. Transcription depends thus on developmentally regulated host-cell factors and is not merely a reflection of the presence of duplex DNA. An attenuation site located ~145 nucleotides downstream from the P4 promoter has been identified. This block could be alleviated by specific cellular factors. Moreover, the promoter for the capsid proteins is activated by NS1.

Parvoviruses interact with host nucleoli. Viral DNA replicates in the host nucleoli and nucleolar protein as well as small nuclear ribonucleoproteins are re compartmentalized. Replicative form DNA is exclusively nuclear-matrix-bound early during infection but accumulates later in the soluble fraction. The DNA-matrix interactions are, at least in part mediated by the viral terminal proteins. ssDNA is encapsidated by the (pro)virion, as described above, usually from the 5' to 3' direction. This process is probably mediated by NS1 and the virus is ready for a new round of infection after the proteolytic maturation step.

Geographic and Seasonal Distribution

All parvoviruses described here have been isolated world-wide, wherever the host is present. However, some strains may have a wider distribution than others. For example, PPV strains involved in the SMEDI syndrome have been detected throughout the world, whereas strains causing vesicular lesions or enteritis have only been reported sporadically. Interactions of PPV

with other porcine viruses are still poorly understood.

It is not known whether similar differences exist for the rodent parvoviruses. Early work showed that many strains differ in serology or hemagglutinating properties from the laboratory strains. A serologic survey from 10 European countries indicated that MVM was among the most prevalent murine viruses in colonies surveyed in the mid- to late eighties. It has been circulating in mouse colonies for at least 20 years. Retrospective testing indicated that the prevalence of MPV approached 40% in the early 1970s whereas only 7% of tested sera contained anti-MVM antibodies. Similarly, several BPV strains have been compared and serology and hemagglutinating differences have been noted. Caution is warranted since comparisons are often not under identical or standardized conditions. For example, different donors of erythrocytes could be responsible for subtle variations.

Seasonal distributions are related to the age distribution of the host if infection occurs at a certain age. For example, GPV usually infects goslings younger than 1 month, although latent infections can be established in older animals. Thus, domesticated or wild geese are usually infected in the spring. Similarly, BPV infects calves but latent infections may develop in older animals. The birthing pattern of the host thus contributes to the seasonality of the infections.

Host Range and Viral Propagation

In general, parvoviruses have a narrow host range, probably due to their high dependence on particular host cell functions. While parvoviruses accumulate mutations at a very slow rate, it has nonetheless been extensively documented that small genomic variations or mutations may lead to phenotypic differences in antigenicity, tissue tropism, host range, virulence or properties such as hemagglutination. It is unknown if these mutations are random or if they appear due to environmental pressures.

The natural host of RV and MVM are rats and mice respectively, as supported by serology and infection studies. All rodent viruses can induce an osteolytic syndrome after perinatal inoculation of hamsters. This syndrome is characterized by dwarfism, mongoloid features,

abnormal teeth and fragile bones because of infection of osteogenic tissues.

About 40 PPV isolates have been obtained from different cell cultures (KB5H from KB cells is the prototype) and it has been suggested that these viruses were introduced with porcine trypsin used in passaging. Field isolates of PPV cluster within four pathogenic groups but, when the region qualified as the allotropic determinant is sequenced, two major groups can be identified. This pattern mainly segregates pathogenic from non-pathogenic isolates while other non-characterized residues or non-coding changes may account for the observed pathologies. Sequencing of the capsid protein gene of isolates originating from Europe and Canada indicate that variations in residues outside the allotropic determinant vary geographically.

Cattle is the natural reservoir of BPV, but goats and possibly horses, may also be a source since many animals are seropositive. Cross-reactivity with until now unisolated viruses cannot be ruled out. Canine, monkey and human sera may also be seropositive, by immunofluorescence, but very low titers are obtained when they are assayed for neutralizing activity. Some cross-reactivity therefore seems more likely. Domesticated and wild geese as well as Muscovy ducks are susceptible to GPV. Chickens and ducks are resistant.

Parvoviruses are most often propagated in cell culture. GPV is usually replicated in embryonated eggs. The reproduction of parvoviruses in tissue cultures can be dependent on the passage number, temperature or the nature of the strain of the same parvovirus. For instance, lymphotropic and fibrotropic strains have been described for MVM, and restricted temperature ranges for different PPV strains (some only at low temperatures, others at 37°C and still others at 39°C). PPV-NADL2 replicates most efficiently in PFT cells at passage 75-100 and hardly, or not at all, above 200.

Genetics and evolution

Rodent and porcine parvoviruses are so closely related that they have probably evolved from a common ancestor. Their relatedness with BPV, Dependovirus or Densovirus is low and decreases in this order, with one interesting exception. The amino acid sequence 10-50 of the VPI capsid protein is also found in the structural protein of many densoviruses (about 90% homology).

Evolution of parvoviruses is evident even in the short time span in which they have been studied. For example, canine parvoviruses, most probably indirectly, evolved from feline parvoviruses. Many of the newly discovered strains with different tropisms may have evolved very recently since only a few (two to three) amino acids are involved in the tropic determinant. It can be speculated that, after a change to a new tropism through one of these amino acids, other mutations may rapidly accumulate until the optimal reproduction rate is obtained.

Parvoviruses have been sequenced to predict the way the genome functions. Subsequently, these predictions were confirmed or rejected by transcription studies and by site-directed mutagenesis of genetic elements (see below). A virulence determinant is also emerging. NS2 nonstructural protein and repetitive elements (at the 5' end of the negative-strand) seem to be involved. For PPV, we have isolated strains having one, two or four repetitive elements (from mummified embryos almost all have one repetitive element; unpublished results).

Transmission and Epidemiology

Parvoviruses can be transmitted horizontally by the fecal-oral route, respiratory exudates, dust, gloves, clothing and food, provided that the susceptibility of the host and the dosage of the virus are sufficiently high. They can also be transmitted vertically. Toolan noted two types of infection, one that is temporary and produces low levels of antibody which disappear within months and a second type of infection which is latent or permanent leading to high antibody titers, maintained throughout life. The latter type is exemplified by neonatal and latent

infections. Similar patterns can be observed for all parvoviruses discussed in this entry. PPV- or BPV-seronegative herds are sometimes found. In most herds, most animals are seropositive but some asymptomatic long-term virus excretors may be present, mostly because of continuous replication in susceptible gut cells.

Horizontal transmission is most common but vertical transmission has been shown for BPV, GPV and PPV. Vertical transmission of the virus leads to the abortion or resorption of the fetus. A few long-term PPV excretors seem to be less efficient in horizontal transmission in age-segregated herds. However, the resistance of parvoviruses to environmental inactivation is believed to be more important than chronic carriers in the epidemiology by horizontal transmission.

The morbidity and mortality rates depend on the susceptibility of the host and the immune status of the herds. Viral infections can range from completely symptomless to mortality rates that, for GPV, may be close to 100%. Again, the strain of the parvovirus is important.

Tissue Tropism and Pathogenicity

The replication of parvoviruses depends on cellular functions, transiently expressed during late S or early G-2 phase of mitosis. Thus, cell division is an essential requirement and parvoviruses infect mitotically active tissues such as those from the fetus, intestinal epithelium and hemopoietic systems. The viruses are considered 'mitolytic', hence their oncosuppressive activities. Additional cellular factors, expressed during differentiation, are also required. Cell division is not the only determinant, and parvoviruses are therefore not truly pantropic. A tropic determinant has been identified in the capsid protein of MVM and in the corresponding region of PPV structural proteins.

The complex set of factors involved in viral pathogenicity is still poorly defined. At a molecular level, much of the current attention is focused on the (until now unknown) role of the viral-encoded NS2 protein and noncoding genetic elements. Both seem to be involved in

pathogenesis or virulence. It is not clear yet whether tropism factors can be completely separated from virulence factors. Curiously, RV, H-1 and MVMp are not pathogenic for their native hosts. Only under experimental conditions, such as intracerebral inoculation of rats with virulent RV, does a disease become apparent. RV and H-1 when isolated, were associated with tumors, and MVM has been isolated from oncogenic adenovirus stocks. All rodent parvoviruses have been shown to suppress carcinogenesis, whether spontaneous, virus-induced or carcinogen-induced. In contrast, MVMi, most PPV strains, BPV and GPV are pathogenic. Mixed infections with other pathogens are common and a role for these parvoviruses in certain diseases is emerging.

There is a striking resemblance between MVM and PPV with respect to tropism and pathogenesis. The nonpathogenic PPV-NADL2 and MVMp are nonviremic whereas the pathogenic PPV-NADL8, PPV-Kresse and MVMi are viremic (ie, high virus titers in blood circulation).

PPV infections are often harmless to the adult animals except for some PPV strains associated with severe dermatitis or enteritis. Non-viremic strains are considered harmless unless inoculated *in utero* prior to immunocompetence where they will cause abortions. Some PPV strains cause embryonic and fetal infections of various degrees through post-viremic transplacental infection during the first 70 days of gestation usually without any manifestation of maternal clinical signs since the adult mounts an immune response but the maternal antibodies do not cross the placenta to protect the fetuses. The infection or death of fetuses after immunocompetence is attained around 70 days is only observed in highly pathogenic isolates such as Kresse and IAF-A54 which are usually associated with necrotic skin lesions in the dams.

The generalized infection of hematopoietic cells, lymphocytes and capillary endothelium leads to bilateral infarcts of the solitary renal papilli for MVMi and fetal infection for PPV. It needs hardly to be emphasized that laboratory diagnosis should distinguish the strains for reliable epidemiological surveys and herd management, instead of mere detection of virus.

Most BPV isolations are from samples from calves with diarrhea, but BPV is increasingly associated with respiratory disease and reproductive failure. Viremia can be established (in leukocytes), and, during the symptomatic phase, different targets become infected (intestinal tissue, brain, heart muscle, adrenal gland, thymus and lymph nodes). Fetal infection after viremia is particularly acute in the first trimester (particularly cerebellum). Active immunity develops in the second half of pregnancy, and a fetus infected in the third trimester usually recovers from the infection.

According to available *in vitro* data, cell tropism relates to the strain properties (capsid amino-acids). Different tropisms among variant strains are also a striking feature of other parvoviruses. An example is the sudden appearance of canine parvovirus in the late 1970s probably due to mutations in a feline parvovirus (*See also: Parvoviruses: Cats, Dogs, Minks*). This flux in parvovirus strains and properties makes them very important, both in disease prevention and fundamental research.

Clinical Features and Pathology

Except for MVMi, natural infections of rodents are clinically inapparent. Experimental infections of rodents may produce (1) an acute lethal disease in newborn animals, (2) an osteolytic syndrome, (3) cerebellar ataxia or (4) hemorrhagic encephalitis. Successive passaging of H-1 or RV in newborn hamsters can increase the pathogenicity in newborn animals to close to 100% mortality. After 4-10 days, infected animals suddenly become sluggish, gasp for breath and die. Necropsy often reveals hemorrhage of the gut and congestion of the liver. In contrast, no liver damage is observed with the RT strain, but intestines often contain a sanguineous exudate. Infected newborn rats become apathetic just before dying. Intranuclear inclusions are found in cells of almost all organs of the animals.

Hamsters surviving RV or H-1 infections usually develop mongoloid features due to osteolytic activity of the parvoviruses [in rodents, osteogenic activity (osteoblasts, odontoblasts) is high]. Cerebellar ataxia can only be introduced by intracerebral inoculation of hamsters younger than 4 days (and is apparent after a month). The HER agent induces hemorrhagic

encephalitis in rats after cyclophosphamide treatment. Upon necropsy, hemorrhage and necrosis are observed in brains or spinal cords of these rats.

The most common feature of an outbreak of PPV reproduction failure is the appearance of mummified fetuses. The litter may contain both mummified and stillborn fetuses. The PPV strain associated with equine abortion has not been reproduced experimentally. Interestingly, this virus also seems to be fetotropic in rabbits. Clinical features of BPV infections, mostly in calves (1-12 months), include enteritis, respiratory disease and conjunctivitis. The severity of the clinical symptoms is usually increased by co-infection with other pathogens and may only be apparent in their presence.

GPV-infected goslings or Muskovy ducklings (at day 1) stop eating after about 3 days, are reluctant to move, remain near a heat source and usually die after a week. Those that survive are usually severely retarded and may become featherless. These animals may also develop a transient leg weakness. When older animals are infected, a symptomless carrier state may be obtained. Birds that succumb in the acute phase after GPV infection have characteristic lesions in the liver and heart muscle. The hyperemic liver contains small grayish-white areas. The apex of the enlarged heart can be rounded off and the myocardium may show a discoloration. Accumulation of fluid in the pericardium and abdominal cavity is often observed.

Immune Response and Prevention

A strong active immunity depends to a large degree on viral multiplication in tissues of the infected organism. The equilibrium between virus produced during latency and the production of circulating antibodies can lead to high antibody titers over long periods. A single injection with cyclophosphamide (immunosuppressive) was shown to be sufficient to convert a latent RV infection into an apparent disease. Toolan observed that infection of pregnant hamsters with H-1 did not yield any antibodies, neither did subsequent inoculations. The reason for this tolerance is not clear.

Passive immunity (maternally acquired antibodies) may protect the fetus against infection in rodents. However, immunoglobulins do not pass through the multilayer placenta (epitheliochorial) in pigs. Production of antibodies in neonatal piglets is the result of active immunity (embryos are immunocompetent from about 70 days on). After birth, pigs can contain high concentrations of PPV antibodies from colostrum while nursing seropositive dams. A similar pattern is observed for BPV; second- and third-trimester fetuses yield an IgM response that is maximum after about 10 days and is gradually replaced by IgG with maximum titers about 5 months after infection. Calves deprived of colostrum from seropositive cows may develop severe diarrhea upon infection.

Viral strains that do not produce viremia can often be used as live vaccines. The NADL2 strain of PPV, but also others such as the HT strain of PPV (no viremia), can be used. Some workers have been able to induce high antibody titers to PPV with inactivated virus. An early management method for PPV was the back-feeding of fecal material or fetal tissues from PPV-infected sows. Infections with BPV are widespread and are clinically inapparent in adults. BPV vaccines are not yet available nor has the need for vaccination been demonstrated.

Conclusion

Initially, parvoviruses attracted attention since it was felt that these small viruses would be simple and easier to understand than most other viruses. It has become clear, however, that they depend more on cellular functions which are more difficult to study. Recent knowledge about parvovirus structures has enabled researchers to focus on the role of structurally conserved motifs during infection and their implication in tropism and host range. The extent of knowledge on MVM made it the an excellent model especially since more is known about the genetic make-up of the mouse than other vertebrates. Other parvoviruses generate increasing interest due to their role in disease and as model in host-virus relationship and structure-function studies.

Further Reading

Berns KI (1990) Parvovirus replication. *Microbiol. Rev.* 54: 316.

Cotmore S and Tattersall P (1987) *Adv. Virus Res.* 33: 91.

Pattison JR (1996) Parvoviruses. In: Fields BN et al. (eds) *Virology*, 3rd ed., chapter 63.
New York: Raven Press.

Siegl G (1976) *The Parvoviruses*. Vienna: Springer-Verlag.

Tijssen P (ed.) (1990) *Handbook of Parvoviruses*, vols I and II. Boca Raton, FL: CRC Press.

Parrish, CR (ed.) (1995) *Autonomous Animal Parvoviruses*.
Seminars in Virology, Vol 6. Issue 5

Table 1. Viral gene products (kDa)

Proteins	MVM, H-1	PPV	BPV	GPV/MDPV
Nonstructural proteins	NS1 (83)	NS1 (86)	NS1 A (83)	REP (65)
	NS2 (21)	NS2 (18)	NS1B(75)	
		NS3 (12)	NS2 (28)	
Capsid proteins	VP1 (86)	VP1 (84)	VP1 (80)	VP1 (81.3)
	VP2 (65)	VP2 (64)	VP2 (72)	VP2 (65)
	VP3 (60)	VP3 (60)	VP3 (62)	VP3 (60)
			VP4 (60)	

Note. Molecular masses of NS2/NS3 of PPV and of GPV REP are deduced from amino acid sequences.

Table 2. GenBank Accession Numbers of Parvoviruses of Rodents, Pigs, Cattle and Waterfowl

Strain / Isolate	GenBank Accession Number
MVMi	X02481
MVMp	J02275
MPV-1	U12469
H-1	X01457
RPV-1a	AF036710
PPV NADL-2	L23427
PPV Kresse	U44978
GPV	U25749
MDPV	U22967
BPV	M14363

*Note: Accession numbers given are those considered with the least number of errors

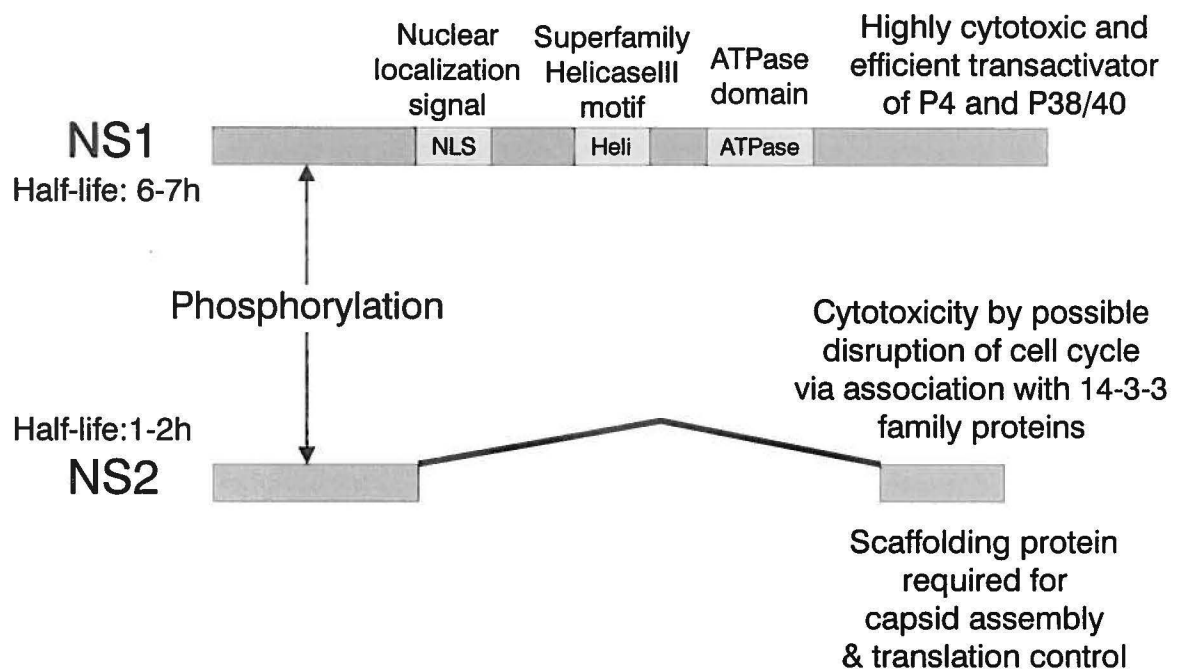
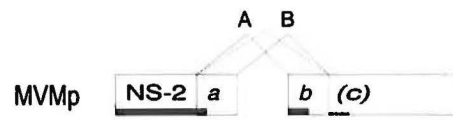
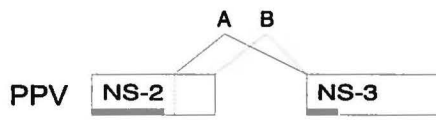
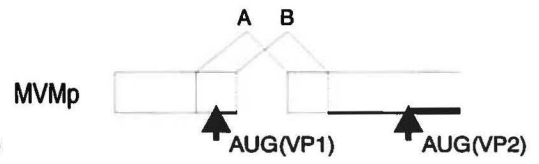
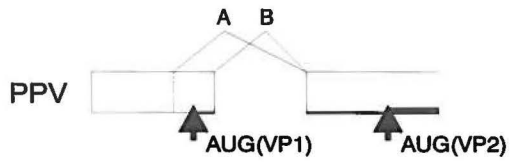


Figure 1. Properties and roles of NS proteins

Figure 2. Comparative alternate splicing of NS transcripts in MVM and PPV.

While MVM has two splicing acceptor sites in the capsid gene ORF, PPV has only one. Nonetheless, the expression strategy remains unaffected by the divergence in splicing patterns. The strategy of NS2 expression differs considerably between MVM and PPV. The MVM genome is organized to yield a maximum of three different NS2 which differ solely at their C-terminal. Normally, only two forms are detected. Although another (fourth) combination would be possible, it is undetectable due to distance constraints of the splicing machinery. In contrast, PPV NS2 terminates upstream from the VP splicing sites and a separate NS3 is generated by splicing the NS2 donor site to the VP acceptor site. *Adapted from Seminars in Virology 6(5):321.*



RELATION STRUCTURE-FONCTION DES PARVOVIRUS

Deuxième partie -- Relation structure-fonction des parvovirus

La compréhension des mécanismes entourant la restriction de l'infection virale dans des sous-populations cellulaires ou de la permissivité cellulaire en général est essentielle au développement de stratégies pour prévenir ou contrer ces infections. Il est tout aussi important de comprendre les mécanismes impliqués dans l'évolution virale afin de déterminer l'utilité potentielle de nouveaux vaccins dans les cas où les souches évoluent et changent de tropisme.

Tel que discuté au préalable, le tropisme cellulaire des parvovirus est déterminé par la capside virale. Bien que les variations de séquences aient été répertoriées pour plusieurs parvovirus, l'impact de ces différences ne peut avoir de signification biologique que si elles nous permettent de comprendre le ou les mécanismes impliqués dans le tropisme (Parrish *et al.*, 1988; Gardiner et Tattersall, 1988; Parrish *et al.*, 1991; Oie *et al.*, 1996). Les structures des capsides virales permettent d'étudier et de comparer des régions différentes en apparence mais structurellement apparentées. Afin de mieux comprendre l'impact des travaux publiés au cours des dernières années portant sur l'étude structurale de la capside de différents parvovirus, un bref aperçu de la littérature sera présenté ici.

2.1 Interaction virus - cellules

2.1.1 Molécules d'attachement du virus

Les parvovirus présentent un modèle complexe de tropisme car dans la plupart des cas étudiés jusqu'à maintenant, celui-ci n'est pas nécessairement déterminé par la présence ou l'absence d'une ou plusieurs molécules permettant l'attachement et la pénétration du virus. Les données publiées contredisent l'idée d'un rôle essentiel d'une telle molécule d'attachement dans le tropisme car autant chez MVMi/MVMp que CPV/FPV, les souches entrent en compétition pour les mêmes récepteurs mais l'infection productive ne se produit que dans un des deux cas (Tattersall et Bratton, 1983; Truyen et Parrish, 1992).

Certains groupes ont identifié des molécules d'attachement ou des composantes de celles-ci par traitement à la neuraminidase dans le cas de MVM (P. Tattersall *et al.*, non publié) ou de BPV (Thacker et Johnson, 1998), par prévention spécifique de l'infection par des anticorps monoclonaux liant une molécule de 40kDa dans le cas du PPV (Harding et Molitor, 1992) ou de CPV (Basak *et al.*, 1994). Par contre, aucun de ces travaux n'a démontré que l'absence de la molécule d'attachement prévient l'internalisation ou l'infection. Dans le cas du PPV, l'internalisation est possible dans le cas de cellules non-permissives (Ridpath et Mengeling, 1988).

Le meilleur exemple demeure celui du parvovirus B19 dont un récepteur cellulaire a été identifié par Kevin Brown (Brown *et al.*, 1993). Bien que l'interaction entre le globoside et le virus ait été clairement démontrée et que même une structure du complexe existe (Chipman *et al.*, 1996), il a été démontré que la présence du globoside à la surface cellulaire n'est pas le seul pré-requis pour permettre une infection productive (Wang *et al.*, 1995).

Si le tropisme viral n'est pas régulé principalement lors de l'attachement du virus, il doit l'être lors de l'internalisation ou lors de la décapsidation du virus puisque la transfection d'un clone infectieux permet de passer outre cette barrière dans certains cas (Gardiner et Tattersall, 1988).

2.1.2 Étapes précoces de l'infection

Les étapes précoces de l'infection par les parvovirus, contrairement aux adénovirus (Greber *et al.*, 1993; Greber *et al.*, 1996; Greber *et al.*, 1997) et aux alphavirus (Perez et Carrasco, 1993; Palokangas *et al.*, 1994; Irurzun *et al.*, 1997; Glomb-Reinmund et Kielian, 1998; Vashishtha *et al.*, 1998; Kronenberger *et al.*, 1998) sont bien peu comprises. Seuls certains travaux portant sur l'internalisation de CPV ont été rapportés (Basak et Compans, 1989; Basak et Turner, 1992; Vihinen-Ranta *et al.*, 1998).

Jusqu'à ce jour, tous les travaux soulignent l'importance des lysosomes durant l'entrée des particules virales. Suite à l'attachement du virus à la cellule, l'internalisation se fait rapidement

via des vésicules non tapissées de clathrine (Basak et Turner, 1992). Les particules virales peuvent être rapidement identifiées par immunofluorescence, principalement à l'intérieur des lysosomes (Weichert *et al*, 1998). Lorsque le transport endocytaire est bloqué à l'aide d'un pré-traitement au nocodazole, les particules virales n'atteignent pas le noyau et aucune réplication virale n'est observée (Vihinen-Ranta *et al*, 1998). Il en est de même pour les agents lysosomotropes qui augmentent le pH des endosomes (Basak et Turner, 1992). L'importance de l'entrée du virus par la voie endosomale est également démontrée par des études de micro-injection où des particules virales matures purifiées demeurent majoritairement dans le cytoplasme (Weichert *et al*, 1998; Vihinen-Ranta *et al*, 1998).

Il semble donc évident que dans le cas du parvovirus canin, un changement de pH soit nécessaire pour permettre au virus de "transporter" son acide nucléique dans le noyau. Par contre, le traitement des particules virales à un pH de 5,0 avant la micro-injection ne permet pas d'avoir une infection productive (Vihinen-Ranta *et al*, 1998). Ce phénomène est probablement dû à la réversibilité des changements observés à des pH plus bas. Un aperçu de la structure des parvovirus nous permettra de discuter la corrélation entre la structure et le rôle du pH dans l'entrée.

2.2 Structure des parvovirus et rôle dans l'infection

2.2.1 Propriétés structurales des parvovirus

La structure tri-dimensionnelle de plusieurs parvovirus a déjà été déterminée. La première structure d'un parvovirus a été publiée en 1991 par le groupe de Michael Rossmann en collaboration avec Colin Parrish (Tsao *et al*, 1991). C'est d'ailleurs le groupe de Michael Rossmann qui a été responsable des études réalisées jusqu'à maintenant sur les autres structures de parvovirus: capsides vides recombinantes de CPV (Wu et Rossmann, 1993), capsides vides recombinantes de FPV (Agbandje *et al*, 1993) et FPV natif (Rossmann *et al.*, non publié), capsides vides recombinantes du parvovirus B19 (Agbandje *et al*, 1994), MVMi (Agbandje-McKenna *et al*, 1998) et GmDENV (Simpson *et al*, 1998).

La capsidite des parvovirus, d'un diamètre approximatif de 260 Å, est composée de trois protéines de capsidite dont la partie C-terminale est identique. Dans le cas des *Parvovirinae*, deux protéines VP1 et VP2 proviennent d'un cadre de lecture chevauchant, issues d'un épissage alternatif alors que VP3 provient d'un clivage protéolytique de la partie N-terminale de VP2 dans les capsidites matures. La composition de la capsidite des *Densovirinae* est plus variable et ne sera pas discutée ici.

La capsidite contient un total de 60 copies d'un mélange de VP1, VP2 et VP3, les trois protéines étant présentes dans une structure identique pour les portions communes. Chaque sous-unité est organisée selon un repliement de feuillets beta connu sous le nom de "*eight-stranded anti-parallel β -barrel motif*" qui est retrouvé dans la majorité des autres structures de virus bien que ceux-ci ne soient pas homologues (Rossmann et Johnson, 1989). Les régions unissant les feuillets beta dans cette structure forment des boucles qui prédominent à la surface de la capsidite. En fait, ces boucles sont responsables de la signature de chaque parvovirus: le degré d'homologie, voire même d'identité, est très élevé dans les feuillets alors que les boucles sont très variables (Chapman et Rossmann, 1993). À titre d'exemple, les structures de VP2 monomérique de CPV et MVM sont présentées à la Figure 3.

Bien qu'elles n'apportent pas de rigidité apparente dans la structure de la capsidite, les boucles n'en sont pas moins importantes, tant au niveau de leur taille que des fonctions attribuées à certaines régions de celles-ci. Diverses boucles ont été définies chez CPV, FPV et MVM, soit les boucles I (35-40 acides aminés), II (~75 acides aminés) et les boucles III et IV d'une longueur totale d'environ 225 acides aminés.

Le repliement des protéines structurales et l'assemblage des différentes sous-unités dans une forme icosaédrale résulte en une topologie irrégulière (tout en étant géométrique) par la présence de protubérances ("*spike*") et de dépressions. Autant pour CPV, FPV et MVM, la capsidite comporte certains éléments topologiques tels qu'une protubérance (environ 70 Å) à l'axe de symétrie d'ordre 3, une légère dépression à l'axe de symétrie d'ordre 2 et un pore cylindrique entouré d'une dépression de 15Å ("*canyon*") à l'axe de symétrie d'ordre 5.

La surface exposée des boucles est composée des résidus qui sont le plus souvent associés au tropisme, au spectre d'hôte et à l'héماغglutination. La relation entre la position des résidus critique et leur fonction commence à être étudiée.

2.2.2 Implication de la capsid e dans l'infection et relation avec la structure

Si la plus grande variabilité des protéines de la capsid e est observée au niveau des boucles de surface, il est donc plausible que celles-ci soient impliquées dans le tropisme et le spectre d'hôte. En effet, les résultats publiés jusqu'à maintenant indiquent que les résidus importants pour diverses fonctions biologiques sont accessibles à la surface de la capsid e.

Le spectre d'hôte de FPV et CPV est régulé par la composition de la capsid e, soit principalement par les résidus 93 et 323 de VP2 (Chang *et al*, 1992). Ces résidus se retrouvent sur la protubérance de 70Å à l'axe de symétrie d'ordre 3. Cette accessibilité a pour résultat de permettre ou encore perturber l'interaction entre cette structure et la cellule lors de l'infection. Il est intéressant de noter que par analogie, il semble que le même mécanisme régule le tropisme du parvovirus porcin (Tijssen *et al*, 1995; Bergeron *et al*, 1996).

D'autres régions de la capsid e sont importantes dans le spectre d'hôte du FPV/CPV tel que démontré par le groupe de Colin Parrish. En effet, la région de la base de la protubérance majeure qui regroupe l'interaction de cinq boucles provenant de trois sous-unités de la capsid e peut moduler le spectre d'hôte sans que d'autres résidus soient modifiés (Parker et Parrish, 1997).

En plus du spectre d'hôte, la relation entre l'héماغglutination du CPV à des érythrocytes et sa structure a été étudiée. Alors que le FPV ne peut héماغglutiner des érythrocytes de singe Rhésus qu'à un pH inférieur à 6,2, l'héماغglutination du CPV est indépendante du pH. À un pH où les deux virus diffèrent dans leurs capacités héماغglutinantes (e.g. pH 7,5), CPV et FPV diffèrent considérablement au niveau de la structure d'une boucle de surface baptisée "HA-loop" (*hemagglutination loop*) située entre les résidus 356-374. Il est important de noter que la séquence peptidique de cette région est identique chez les deux virus. Par mutagenèse,

il a été démontré que la conformation de cette région de la boucle III/IV est déterminée par les résidus 323, 375 et 377, situés à proximité mais ne faisant pas partie de cette boucle (Barbis *et al.*, 1992).

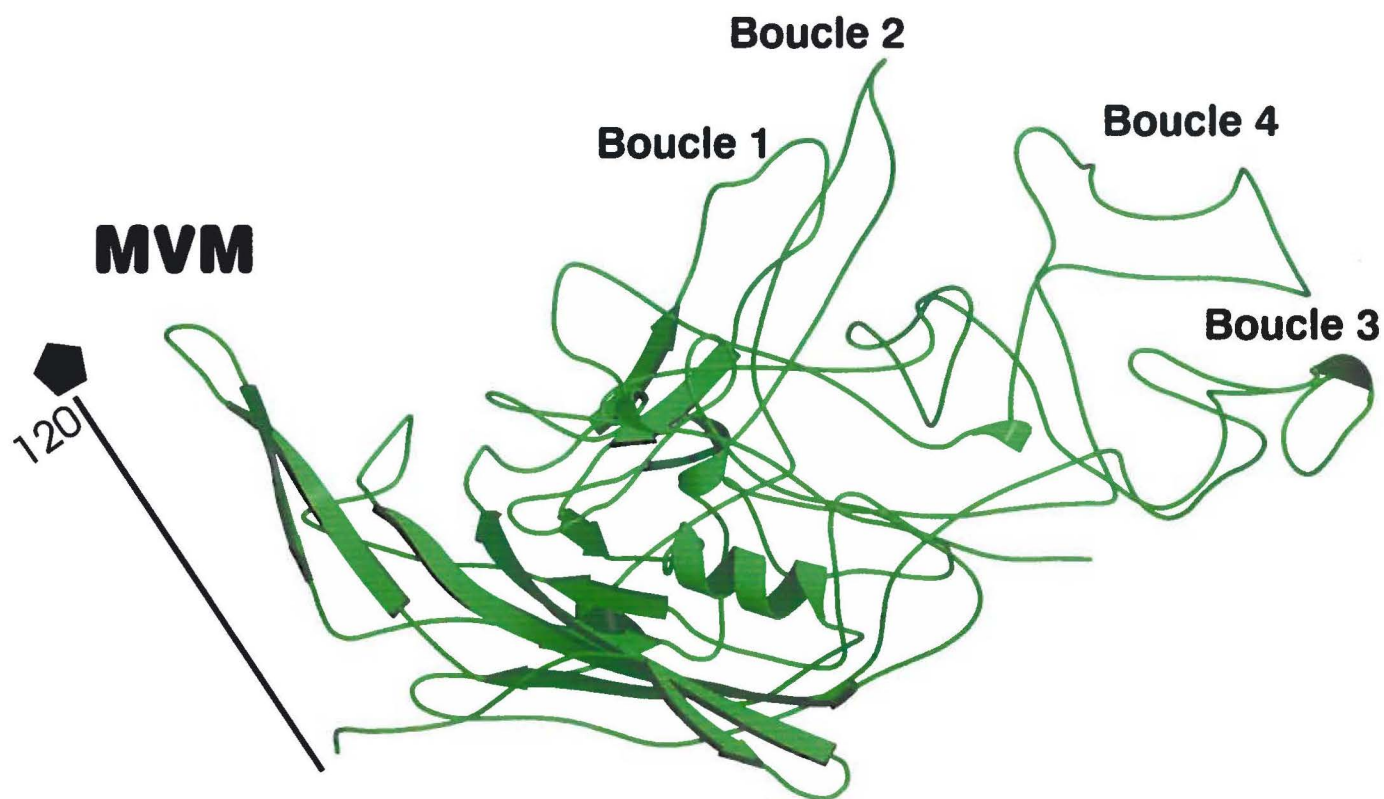
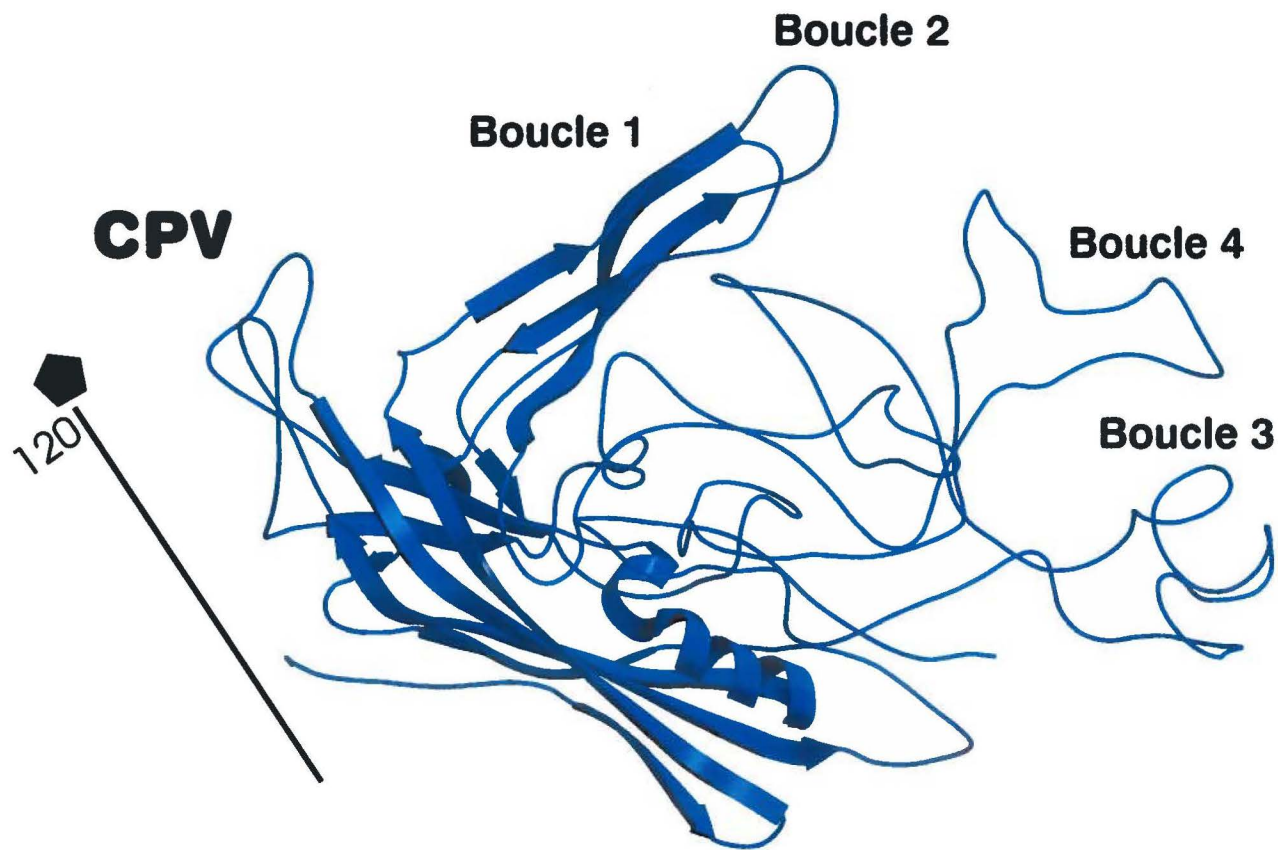
La relation entre la position de cette boucle et son rôle dans l'hémagglutination ou encore la liaison d'ions divalents n'est pas encore clarifiée (Rossmann *et al.*, non publié). En effet, des structures de FPV et CPV obtenues à partir de virus ou capsides recombinantes cristallisées à divers pH (5,5, 6,5 et 7,5) démontrent que cette boucle est très variable mais que le pH, à lui seul, n'explique pas les observations biologiques.

2.3 Conclusion

Tout comme le génome viral, la capside des parvovirus semble très simple *a priori*. Bien qu'elle soit composée principalement d'une protéine, plusieurs fonctions biologiques sont associées à la capside virale. Malgré le nombre important de structures déjà obtenues, aucun mécanisme universel expliquant le tropisme des parvovirus n'a encore été démontré. Bien qu'un tel mécanisme n'existe peut-être pas, certaines ressemblances existent probablement. Les études ciblées sur l'interaction entre la capside virale et certaines composantes de la cellule permettront de mettre à la lumière de tels mécanismes, surtout si l'étude cristallographique de complexes virus-molécule est possible dans ce cas.

Figure 3. Structures de CPV et MVM.

Les boucles de surface sont identifiées afin de voir la ressemblance au niveau de leurs positions relatives. On voit que le corps de la protéine consiste en des feuillets beta qui permettent une stabilité accrue.



SECTION II

Chapitre 1

CHAPITRE 1 SÉQUENÇAGE DE LA SOUCHE KRESSE DU PARVOVIRUS PORCIN ET ANALYSE MOLÉCULAIRE DES BASES DU TROPISME *IN VITRO*.

Avant-propos

Environ 8 ans avant la réalisation des travaux présentés ici, l'existence de souches très pathogéniques de parvovirus porcin avait été démontrée (Kresse *et al*, 1985). Les différences entre certaines souches pathogéniques et non pathogéniques avaient été étudiées du point de vue biologique mais aucune information moléculaire ne permettait de comprendre le ou les mécanismes impliqués (Choi *et al*, 1987). De plus, la présence de souches très virulentes avec un tropisme cellulaire étendu devenait une préoccupation étant donné que rien ne permettait alors de les distinguer des souches pathogéniques classiques et de déterminer si les vaccins utilisés pouvaient potentiellement agir contre ces souches.

Les travaux antérieurs à ceux présentés ici ont permis de comprendre en détail l'organisation génomique du parvovirus porcin grâce au séquençage complet de la souche vaccinale NADL-2 et à l'étude de la transcription (Bergeron *et al*, 1993). En raison des différences liées à la pathologie qui distinguent ces deux souches, nous avons entrepris de séquencer la souche Kresse du PPV et de la comparer avec la souche vaccinale NADL-2. De plus, nous avons séquencé partiellement d'autres isolats provenant de cas cliniques du cheptel porcin québécois.

Ces travaux nous ont permis de démontrer que des différences localisées principalement dans le gène de la capsid se traduisent également dans la séquence peptidique et peuvent potentiellement être responsables des signes cliniques observés. Étant dans l'impossibilité de poursuivre des travaux *in vivo* sur des truies gestantes à cause de contraintes physiques, nous avons mis sur pied un système cellulaire *in vitro* permettant de distinguer les souches pathogéniques et non-pathogéniques tel Kresse et NADL-2.

Ce système cellulaire a rendu possible l'identification du profil biologique des souches par une différence de tropisme *in vitro*. Afin de déterminer quelle différence génomique au niveau de la capside virale était responsable du profil observé *in vitro*, nous avons construit des chimères de PPV. Nos résultats ont permis d'identifier que trois résidus de la capside, ou moins, pouvaient modifier le tropisme cellulaire observé *in vitro*.

Les résultats présentés ici constituent la première preuve que le tropisme *in vitro* du PPV est uniquement régulé par la capside virale dans ce système mais diffère de certains résultats publiés antérieurement. Ces différences sont discutées dans la publication.

Finalement, par analogie au cas de CPV et FPV, nous suggérons que le tropisme observé *in vitro* reflète probablement une différence de tropisme soit cellulaire ou tissulaire *in vivo* pour ainsi expliquer, même partiellement, les différences de pathologies qui découlent de l'infection par NADL-2 ou Kresse.

**Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus:
Identification of the Allotropic Determinant and Comparison with
Those of NADL-2 and Field Isolates**

J. Bergeron, B. Hébert and P. Tijssen*

Running title: PPV Kresse genome organization and tropism determinant

* Corresponding author.

Mailing address:

Centre de recherche en virologie,

Institut Armand-Frappier,

Université du Québec

P.O. Box 100, 531 boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada H7N 4Z3

Phone: (514) 687-5010, ext. 4425

Fax.: (514) 686-5626

Electronic mail address: peter_tijssen@iaf.quebec.ca

This work will be submitted in part by B.H. in a thesis to the Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree.

Both J.B. and B.H. contributed equally to the work presented in this publication.

J. Virol 70(4): 2508-2515 // Ref. Number JVI 1353-95

ABSTRACT

The Kresse strain of porcine parvovirus (PPV) was cloned into pUC19, and independent infectious clones were sequenced. The PPV Kresse and NADL-2 strains, which have different pathogenicities, shared an identical genomic organization and a high degree of sequence identity. Partial genomes (1.5 or 1.6 kb) of 15 field isolates were also amplified by PCR in regions with significant sequence differences between the laboratory strains. Five amino acid differences were consistently present within the VP1/VP2 coding region of the Kresse strain and virulent field isolates. A number of inconsistent point mutations were also found throughout the genomes of field isolates. In addition, among those with the vaccine amino acid profile, all but one isolate (IAF-3) contained a 127-bp noncoding direct repeat downstream of the capsid protein gene. The one exception was also the only vaccine-type PPV obtained from a mummified fetus. In order to identify genetic elements responsible for the distinct tropism (and possibly the pathology) of the Kresse strain, *in vitro* cell systems which differentiated the virulent from the vaccinal strains were established. Subsequently, chimeric infectious clones of the Kresse and NADL-2 strains were used to identify the allotropic determinant located in the VP1/VP2 region. The transfer of the *Bgl*II fragment of the Kresse genome, containing three amino acid differences, into the NADL-2 background, or the opposite construct, caused the phenotype of the target genome to revert to that of the parent strain of the *Bgl*II fragment. Prediction of the localization of amino acid differences on the basis of canine parvovirus capsid structure, indicates that each is located on or near the outer surface of the virion. In particular, the position of one mutation (S-436→P) maps by analogy to the threefold spike, the most accessible region of the capsid.

INTRODUCTION

Porcine parvovirus (PPV) is an autonomously replicating parvovirus with physicochemical properties and genomic sequences which resemble those of minute virus of mice (MVM) and H-1 rodent parvoviruses, and which particularly resemble those of canine parvovirus (CPV) and feline panleukopenia virus (FPV) (reviewed in references 9 and 32). PPV is the major causative agent in a syndrome of reproductive failure in swine, which includes stillbirths, mummified fetuses, early embryonic death, and infertility (11, 17). PPV strains can be distinguished by their differential pathogenicity (20). The nonpathogenic NADL-2 strain, which is currently used as an attenuated vaccine, causes only a limited viremia and, in experimental infections, does not cross the placental barrier (24). In contrast, virulent strains isolated from mummified fetuses, such as NADL-8 and IAF-76, cause a viremia and cross the placenta resulting in fatal infection of nonimmunocompetent fetuses (16). Although NADL-2 is innocuous when administered orally, it is responsible for fetal death when injected directly *in utero* into extrafetal fluids (10). Strain NADL-8 was both infectious and lethal at much higher dilutions than was strain NADL-2 (>10,000-fold [18]).

A third group of virulent PPV strains, such as the Kresse and IAF-A54 strains, have been associated with dermatitis (15). These dermatitis strains display an increased virulence and, in contrast to the other virulent strains, kill immunocompetent fetuses (8). Finally, a fourth group of PPVs has recently been recognized by our laboratory after PCR amplification of parvovirus DNA from enteric samples (Dubuc *et al.*, unpublished observation). These enteric strains (IAF-A83), recently involved in large outbreaks, have been characterized only partially (unpublished observations).

The mRNAs of NADL-2 have been isolated, cloned, and sequenced (5). All splicing patterns and the 5' and 3' ends of the mRNAs have been identified. The genome contains two promoters — the P4 promoter leading to the expression of the nonstructural (NS) NS1, NS2 and putative NS3 proteins, which are involved in a number of replicative functions of the

virus; and the P40 promoter, which is involved in expression of a nested set of structural protein-coding sequences termed VP1 and VP2 with molecular masses of 80.9 and 64.3 kDa, respectively (reviewed in reference 31). Three NS protein gene transcripts have been identified. The 4.7-kb transcript is not spliced in the NS gene and was predicted to code for a 75.5 kDa protein (NS1). The two differently spliced 3.3-kb NS transcripts code for the NS2 protein (18.1 kDa). A 2.9-kb transcript would code for an NS3 protein (12.4 kDa), although such a protein has never been described for other parvoviruses.

Our objectives are to obtain a better understanding of the molecular biology of PPV and to identify the mechanisms responsible for differences in the biological activities of the various strains. In the present study, the complete Kresse strain genome was cloned and sequenced. In addition, partial sequences of several infectious clones were determined. The genomic organization of PPV Kresse was found to be almost identical to that of NADL-2, but key differences were observed in the region coding for the capsid proteins. The allotropic determinant has been identified with chimeric constructs and was compared with those of several PPV strains and virus isolates which were obtained from a relatively large number of aborted fetuses and normal tissues.

(This work will be submitted in part by B.H. in a thesis to the Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier, in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree.)

MATERIALS AND METHODS

Enzymes, reagents and oligonucleotides. Enzymes (restriction endonucleases, polymerases, phosphatases, kinases and ligases) were obtained from Gibco-BRL, Boehringer-Mannheim, New England Biolabs, Pharmacia Biotech, or Promega. [α - 35 S]dATP (800 Ci/mmol) was purchased from Amersham Corporation. Oligonucleotides were synthesized on a Gene Assembler Plus (Pharmacia). Oligonucleotides used for primer-walking sequences are not indicated because of space limitations, whereas the following were used for PCR amplification: PPV-PR05G (positions 3262 to 3291), 5' GTGGGTACAGAATCAGC AACCTCACCACC; PPV-PR06 (positions 4858 to 4833) 5' GTTAATAGTAAACACATGA GAGCTTG 3'; PPV-PR27 (positions 3277 to 3295) 5' GTGGGTACCAGAATCAG CAACCTCACCACCA 3'.

Cell lines and production of virus. Kresse parvovirus was kindly supplied by M. L. Frey (National Veterinary Service Laboratory, Ames, Iowa), while the NADL-2 reference strain was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC VR-742). Several PPV isolates were obtained from thyroid cells (obtained from a local slaughterhouse), whereas other isolates were obtained from samples (fetuses, mummies and lungs) submitted to the Service de diagnostic virologique (MAPAQ) at our institute.

Two cell lines and one primary cell culture were used throughout the experiments reported. The porcine testis (PT; a clone from swine testis [ST] cells) and porcine fallopian tube (PFT[6]) cell lines and TV cells, a primary culture of bovine testis cells, were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with penicillin (100 IU/ml), streptomycin (50 µg/ml), and 8% fetal bovine serum (HyClone).

The characterization of PFT cells has been discussed in a prior publication (5). The susceptibility of PFT cells to PPV was established at many passages (susceptibility varies with passage number) but for virus production, only PFT cells at passages 85 to 90, PT cells at

passage 190 to 210, or TV cells at passage 3 to 5 were used. Semiconfluent cells were infected with PPV at a multiplicity of infection of 0.1 to 2.0 and, after a 2-h absorption period at 37°C, the cells were trypsinized and the culture was split at a ratio of 1:3.

Cells with a pronounced cytopathic effect (7 to 10 days postinfection [p.i.] for PFT cells but 4 to 7 days p.i. for PT cells) were frozen and thawed three times, and then the cellular debris was removed by centrifugation for 30 min at 8,000 x g. For virus purification, one-fifth volume of 20% polyethylene glycol 8000 - 2.5 M NaCl was added to the supernatant. The virus was collected by centrifugation for 30 min at 30,000 x g after an overnight incubation at 4°C, and the pellet was dissolved in a small volume of 1x TE (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA).

Cloning of the Kresse genome and PCR amplicons from field isolates. Replicative form DNA from the Kresse strain was extracted from infected PT cells (24 h, p.i.) as previously described (5). The DNA was subjected to electrophoresis in agarose (0.8%), and the viral replicative form DNA band at a position corresponding to approximately 5 kbp was excised and electroeluted. Complete genomic replicative form DNA (after being blunt-ended with S1 nuclease and Klenow enzyme) was cloned into *Sma*I-digested pUC18. XL1-Blue competent cells were transformed with 10 ng of DNA by standard methods (29). Genomes from other PPV strains were either cloned as for the Kresse strain or partial genomes were amplified by PCR from 5 µL of cell culture supernatant with primers PPV-PR5 and PPV-PR6 (yielding fragments from positions 3389 to 4857) followed by cloning in pUC19. These constructs were sequenced from 66 to 91 map units. Another field isolate, IAF-A54, was amplified with primers PPV-PR27 and PPV-PR6 which generated a 1.6-kbp fragment. Semidirectional cloning of this fragment into pBluescript II KS- was performed after blunting the amplicon followed by digestion with *Hind*III.

Determination of nucleotide sequence. The nucleotide sequence of the Kresse strain and field isolates was determined by primer walking. Approximately 30 primers synthesised according to the NADL-2 strain sequence were used to sequence the Kresse strain (5). The

sequence was determined either by the conventional dideoxy chain termination method with [α - 35 S]dATP (30) or by the dideoxy chain termination method on an A.L.F. automated sequencer with the Autoread kit (Pharmacia Biotech). Terminal hairpins were resolved on conventional sequencing gels containing 30% formamide as previously described (5). Sequence differences in clones obtained after PCR amplification were confirmed with clones derived from independent amplifications to rule out PCR-generated differences.

Sequences were analyzed and aligned with either software package DNAsis v6.00 (Hitachi) or PC/Gene v6.7 (Intelligenetics) or applications from the GCG suite (v7.2; Genetics Computer Group).

Infection and transfection in different cell lines. Semiconfluent monolayers of PT or PFT cells were transfected with approximately 10 μ g of undigested PPV clones per 10^6 cells by the calcium phosphate method described by Merchlinsky *et al.* (19). The production of virus was monitored by agglutination of guinea pig erythrocytes and confirmed by electron microscopy (2). Infections of PT, PFT, and TV cells were performed as described above, except that cells were not split when the relative infectivity of the chimeric constructs was compared with that of the wild-type virus.

Allotropic determinants. Chimeric constructs were generated from either cloned NADL-2 or Kresse. The *Bgl*III fragment was digested, dephosphorylated with calf intestinal phosphatase and gel purified. Fragments from NADL-2 and Kresse were recloned in the other background strain. Clones were transfected in PT cells as described above and chimeric viruses were isolated from cultures 5 to 7 days p.i.. Virus was isolated from the cells after three freezing-thawing cycles and was regrown only once to avoid culture-induced changes. The recombinant nature of the chimeras was determined by differential PCR and sequencing.

Nucleotide sequence accession number. The sequence for PPV Kresse has been deposited with the Genome Sequence Database and was assigned accession number U44978.

RESULTS

Sequence analysis of PPV Kresse and genome organization. The nucleotide sequence of infectious clones of PPV Kresse and its genomic organization were determined (Fig. 1). The sequencing of the genome termini required the addition of 30% formamide to the gel in order to resolve all compressed areas such as the heavily compressed 3'-terminal palindrome of the positive strand. Like the NADL-2 strain, the Kresse genome contains two large open reading frames (ORFs). The translated left ORF had a similarity of approximately 80% to the NS1 protein of MVMp (3) and the translated right-hand ORF was found to have a homology of about 56% with VP1 of MVMp while the similarity to the CPV ORFs showed identities of 67% and 75%, respectively.

A number of differences between the NADL-2 and Kresse genomes were identified. The non-coding regions of the genomes are nearly identical (two differences). All four of the differences found in the NS region are silent while six out of eight of those located in the structural region genes (VP1/VP2) alter the coding sequence. All of these differences are located in the VP-2 coding region except for one in the VP1 unique portion (A-92→R).

In contrast to NADL-2, in which a repetition of 127 nucleotides was found directly after the right-hand ORF, the Kresse strain did not contain such a repetition. Furthermore, a nucleotide difference at the end of what would be the first repeat (C-4660→A) was observed. The presence or absence of this repeat was confirmed by PCR (primers PPV-PR6 and PPV-PR7) and by direct sequencing of the viral genome (primer PPV-PR7).

Comparison of different PPV isolates. Analysis for the presence of the 127-bp repeat downstream of the ORF of the structural proteins in the genomes of several field isolates obtained from mummified embryos and thyroid cells (e.g. isolate IAF-22) since 1986 (15 independent samples) showed that all of the genomes lacked this repeat.

As mentioned previously, the Kresse and NADL-2 genomes shared a high degree of sequence identity. Among the 529 amino acids of VP2, five changes were consistent by being present in field isolates (I-215→T, D-378→G, H-383→Q, S-436→P, and R-565→K) (Fig. 2). Among those with the NADL-2 amino acid pattern in these five key locations, only one strain that lacked the 127-bp repeat (IAF-3) was isolated from a mummified fetus.

Tissue tropism and production of virus. Levels of viral replication on PT and PFT cells was not identical. The NADL-2 strain replicated at higher titers than Kresse in both PT and PFT cells. Although the NADL-2 strain yielded similar titers on both cell lines, the Kresse strain replicated better on PT cells than on PFT cells. TV cells supported the replication of PPV NADL-2, but not that of PPV Kresse. TV cells were therefore used as indicator cells in the study of the viral tropism.

The titer of TV cells inoculated with PPV NADL-2 was approximately 10^3 -fold lower than that on PT or PFT cells. No differences in virus yield were observed between the incubations at 37°C and those at 39°C (body temperature of the pig) for either virus or cell line when the cells were permissive.

Chimeric infectious clones. In attempts to cause the phenotype of the Kresse strain to revert to that of the NADL-2 strain, we exchanged the *BgIII* fragments among the infectious clones of these strains. This resulted in the exchange of three critical mutations located within the VP1/VP2 capsid gene (Fig.3). Progeny viruses from these chimeric clones, obtained from either PT or PFT cells, were all infectious in PT and PFT cells. Titers obtained after infection of PT, PFT and TV cells with either chimeric viruses or native NADL-2 and Kresse virus are shown in Fig. 3. Parallel infection of PT and TV cells with the chimeras resulted in a pattern typical of the wild type strains from which the *BgIII* insert originated. Consequently, chimeric virus which harbored the Kresse *BgIII* insert did not replicate in TV cells.

DISCUSSION

In contrast to previous reports (21), PPV strains replicated at low titers on ST cells and not at all on MDBK cells in our laboratory. This may have been due to the passage number, because PT cells (a clone from ST cells) were permissive and yielded productive infections (5). Given the many requirements for parvovirus replication in cell culture, cellular systems have been developed to discriminate between virus strains, including, for example, those of MVM (9). We were able to develop a cellular system which enabled us to discriminate virulent from avirulent strains by their cellular tropism.

The sequencing of the Kresse strain revealed that minor coding differences located within the VP1/VP2 coding region are responsible for the differential tropism observed *in vitro*. Five of these differences were also consistently present (with one particular exception, [described below]) present in virulent field isolates. Differences were not found in the so-called control regions of the virus (promoters and splicing junctions), and Kresse transcription mapping and transcript processing are identical to those NADL-2 (Hébert *et al.*, unpublished observations).

Previous investigations into the tropism of MVMi/MVMp and CPV/FPV strains have shown that the allotropic determinants are located on the capsid protein (1, 13, 22, 23, 33). For MVM, mutations at amino acid positions 316 and 320 (of VP2) were shown to be sufficient to obtain a different (extended) tropism (4). Residues similarly located on the CPV/FPV capsid are responsible for the feline host range, such that residues 80, 564, and 568 differ between CPV and FPV (31). Among the five consistent changes between nonvirulent and virulent PPV strains, none corresponded exactly to the positions which are critical in MVM and CPV, although the inconsistent change I-470→M was at the same position as E-320→G of MVM VP2.

The chimeric constructs (*Bgl*III fragment exchange) carry the differences found at positions 378, 383 and 436 (VP2 numbering). Extrapolation from the three-dimensional

structure of the closely-related CPV, determined by X-ray crystallography (33), suggests that D-378→G would be located at or near the base of the threefold spike but not on the surface of the virion. The change S-436→P, on top of the threefold spike, may be particularly critical as the replacement of this serine by a proline probably results in a considerable modification of the local topology because of the constraints imposed by the imino acid structure of proline. Although this change appears to be dramatic, the presence of localized differences (I-215→T, H-383→Q and R-565→K) within the twofold depression is potentially as important and meaningful, since both CPV and MVM host range residues and CPV hemagglutination residues are in the vicinity (Fig. 4).

Interestingly, Vasudevacharya and Compans (34) obtained a PPV mutant with NS and capsid protein changes which is adapted to canine A72 cells. Our results for field strains suggest that the capsid proteins are entirely responsible for the tropism of these viruses. Therefore, the *in vivo* relevance of the mutation found within the NS gene of the N2 mutant is not clear. On the other hand, while the 127 bp repeat was not responsible for the difference in tropism found between Kresse and NADL-2, it could be involved in virulence. It must be emphasized that the parental Kresse strain is different from the chimera because of the presence of the repetition within the chimeric clone deriving from NADL-2 (Kresse fragment). Therefore, we cannot assess if only the capsid structure is responsible for *in vivo* differences found between NADL-2 and Kresse, although we may speculate, on the basis of analogies with CPV and MVM, that the initial events are solely capsid dependent. Thus, the correlation between the *in vitro* tropism and the pathogenicity in pigs remains to be established.

The virulent PPV strains and field isolates in our study all lacked the 127 bp repeat. By analogy, MVM(i) also lacks the 65-bp repeat (3). The tandem repeat may be important for replication, because Salvino *et al.* (28) observed that removal of one copy of the repeat in MVMp inhibited replication *in cis* by 10- to over 100-fold (depending on the host cell). One virulent PPV isolate (IAF-3) with the vaccine-like amino acid pattern also lacked the tandem repeat present in NADL-2. This suggests that a different cell tropism among PPV strains is at most partially responsible for the different pathogenicities. Moreover, this tropism

determinant does not explain the difference between classical virulent and more virulent dermatitis strains.

The origin and role of the vaccine-like PPV strains associated with mummification are obscure. NADL-2 is widely used as an inactivated vaccine. Even when inactivation would be incomplete, NADL-2 is expected to be safe (24). However, experimental conditions may differ from field conditions, and coinfections may condition the susceptibility of the host. Secondly, inconsistent mutations in the vaccine-like genomes (e.g., IAF-3) suggest that they may have been present in the population for some time already. These mutations may have arisen from non-inactivated vaccine in the host or during repeated passages by the vaccine producers. Whether the loss of the repeat in these vaccine strains may convert them to virulent strains remains to be established.

While the permissivity of many viruses is solely determined by the presence or absence of virus attachment molecules, the dependence of parvoviruses on host-cell functions is greater than that of most viruses due to their small coding capacity which imposes further prerequisites for permissivity. Oraveerakul *et al.* (21) showed that cell lines differing in their ability to support PPV replication internalize radiolabeled PPV (in both nonpermissive [MDCK] and permissive [ST] cells). Their studies confirm flow cytometry results (26) that demonstrated that PPV is internalized by both permissive and nonpermissive cells. The capsid protein could have a role in uncoating or could interact with a specific host cell factor involved in DNA transcription (particularly NS genes). Earlier, Gardiner and Tattersall (12) presented evidence that MVM gene expression is modulated by the viral particle and that different mechanisms regulate viral gene expression in transfected and infected cells. Since cellular factors have no effect during transfection, a modified capsid may extend (possibly by the modulation of the ability to interact with such cellular factors) the tropism to other cells (4,34). The impact of cellular factors on the restriction of PPV replication and their role in viremia and the modulation of the ability of certain strains to pass the placental barrier remain to be established.

Acknowledgements

Both J.B. and B.H. contributed equally to the work presented in this publication.

We thank Jacques Beaubien, Lise Forget and Joanne Roger for technical assistance; François Shareck for synthesis of oligonucleotides; A. Bouillant (Agriculture Canada), who kindly provided PFT cells; and Grégoire Marsolais (MAPAQ) for sharing TV cells and clinical isolates. We are grateful to Colin R. Parrish and Mavis Agbandje for stimulating discussions. We further thank Mavis Agbandje for generating the CPV Roadmap with PPV information.

This work was supported in part by a grant to P.T. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada.

REFERENCES

1. **Antonietti, J., P. Sahli, P. Beard and B. Hirt.** 1988. Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *J. Virol.* **62**:552-557.
2. **Arella, M., S. Garzon, J. Bergeron, and P. Tijssen.** 1990. Physicochemical properties, production and purification of parvoviruses, p. 11-30. In P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*, vol. A. CRC Press, Boca Raton, Fla.
3. **Astell, C. R., E. M. Gardiner, and P. Tattersall.** 1986. DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVM(i), and a comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J. Virol.* **57**:656-669.
4. **Ball-Goodrich, L.J., R.D. Moir, and P. Tattersall.** 1991. Parvoviral target cell specificity: acquisition of fibrotropism by a mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice involves multiple amino acid substitutions within the capsid. *Virology* **184**:175-186.
5. **Bergeron, J., J. Menezes, and P. Tijssen.** 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* **197**:86-98.
6. **Bouillant, A. M. P., P. Genest, and A. S. Greig.** 1981. Nontumoral, benign and malignant stages of transformation of a diploid pig cell line. A review. *Can. J. Comp. Med.* **45**:279-290.
7. **Chapman, M.** 1993. Mapping the surface properties of macromolecules. *Protein Sci.* **2**:459-469

8. **Choi, C.S., T.W. Molitor, H.S. Joo, and R. Gunther.** 1987. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Vet. Microbiol.* **15**:19-29.
9. **Cotmore, S.F., and P. Tattersall.** 1989. A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J. Virol.* **63**:3902-3911.
10. **Cutlip, R.C. and W.L. Mengeling.** 1975. Pathogenesis of *in utero* infection: experimental infection of 8- and 10-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* **36**:1751-1754.
- 10a. **Dubuc, R., B. Hébert, G. Marsolais and P. Tijssen.** Unpublished observations.
11. **Dunne, H. W., J. C. Gobble, J. R. Hokanson, D. C. Kradel, and G. R. Bubash.** 1965. Porcine reproductive failure associated with a newly defined "SMEDI" group of picornaviruses. *Am. J. Vet. Res.* **26**:1284-1290.
12. **Gardiner, E. M., and P. Tattersall.** 1988. Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J. Virol.* **62**:1713-1722.
13. **Gardiner, E. M., and P. Tattersall.** 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **62**:2605-2613.
14. **Gu, M.-L., F. X. Chen, and S. L. Rhode.** 1992. Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), and SP1 site, and a TATA box for full activity. *Virology* **187**:10-17.
- 14a. **Hébert B., R. Dubuc and P. Tijssen.** Unpublished observations.

15. **Kresse, J.I., W.D. Taylor, W.W Stewart, and K.A. Fernisse** 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Vet. Microbiol.* **10**:525-531.
16. **Mengeling, W.L., and R.C. Cutlip.** 1975. Pathogenesis of *in utero* infection: experimental infection of 5-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* **36**:1173-1177.
17. **Mengeling, W. L., and R. C. Cutlip.** 1976. Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* **37**:1393-1400.
18. **Mengeling, W. L., Z. Pejsak, and P. S. Paul.** 1984. Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *Am. J. Vet. Res.* **45**:2403-2407.
19. **Merchlinsky, M. J., P.J. Tattersall, J. J. Leary, S. F. Cotmore, E. M. Gardiner, and D. C Ward.** 1983. Construction of an infectious clone of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J. Virol.* **47**:227-232.
20. **Molitor, T. W., and H. S. Joo.** 1990. Clinical and pathological features of porcine parvovirus-related disease and its diagnosis. *In* P. Tijssen (ed.), *Handbook of Parvoviruses*, vol. II, p. 135-150. CRC Press, Boca Raton, Fla.
21. **Oraveerakul, K., C.-S. Choi, and T. W. Molitor.** 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J. Virol.* **66**:715-722.
22. **Parrish, C. R.** 1991. Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* **183**:195-205.

23. **Parrish, C. R., and L. E. Carmichael.** 1986. Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus. *Virology* **148**:121-132.
24. **Paul, P. S., and W. L. Mengeling.** 1980. Evaluation of a modified live virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *Am. J. Vet. Res.* **41**:2007-2011.
25. **Rhode, S. L., III, and Richard, S. M.** 1987. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**:2807-2815.
26. **Ridpath, J. F., and W. L. Mengeling.** 1988. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggest specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res.* **10**:17-28.
27. **Sakurai, M., T. Nishimoro, C. Ushimi, and H. Nakajima.** 1989. Nucleotide sequence of capsid protein gene of porcine parvovirus. *Virus Res.* **13**:79-86.
28. **Salvino, R., M. Skiadopoulos, E.A. Faust, P. Tam, R. O. Shade, and C. R. Astell.** 1991. Two spatially distinct genetic elements constitute a bipartite DNA replication origin in the minute virus of mice genome. *J. Virol.* **65**:1352-1363.
29. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
30. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5463-5467.

31. **Truyen, U., M. Agbandje, and C. R. Parrish.** 1994. Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology* **211**:494-503.
32. **Truyen, U., and C. R. Parrish.** 1995. The evolution and control of parvovirus host ranges. *Semin, Virol.* **6**:311-317.
33. **Tsao, J., M. S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Luo, T. J. Smith, M. G. Rossmann, R. W. Compans, and C. R. Parrish.** 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**:1456-1464.
34. **Vasudevacharya, J., and R. W. Compans.** 1992. The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology* **187**:515-524.

FIG. 1. Complete nucleotide sequence of the Kresse strain of PPV (positive strand) and restriction sites of major endonucleases. The sequence of viral transcripts and translation products was predicted from NADL-2 transcription mapping (5). a and b, ATF sites; c, CAAT box; d and e GC box; f, TATA box of the P4 promoter predicted from location of NS transcripts; g, initiation codon of NS proteins; ▼h, donor splicing site of NS-2 and NS-3; i, enabler; j, GC box; k, CAAT box; l, TATA box of the P40 promoter as predicted from VP-transcripts; ▼m, acceptor splicing site of NS-2; ▼o, donor splicing site of VP-2; q, initiation codon of VP1; ▼r, donor splicing site of VP1; ▼s, acceptor site of VP1 and NS3; u, initiation codon of VP2; p, poly(A) site; t, stop codons after translation regions; <>, beginning and end of terminal palindromes; [], beginning and ends of 127-bp repeats; { }, beginning and end of 14-bp centre of putative trans-activation region (100% homology and same location with respect to P40 as transactivation region element of H-1 parvovirus (14, 25); ** begin/end of repetition in NADL-2. The initiator protein motif is underlined; the superfamily III helicase motif is double underlined.

<> 20 a 40 60 80 b 100
AATCTTTAAACTGACCAACTGTCTTTGCGTATGGTGACGTGATGACGCGCGCTACGCGCGCTGCCTTCGGCAGTCACACGTCACCATCAGCAAAGACAGT
c <>120 140 d 160 e 180 f
TGGTCAGTTTAAAGATTAATAAGACATTCCATTGGCTGAAAAGAGGCGGAAATTCAAAAAAGAGGCGGGAAAAAAGAGGTGGAGCCTAACACTATAA
220 240 260 280 *Pst*I g 300
ATACAGTTGCTTACTTCAGTTAGTTCTTTCTGCTTCAGACTGCACTTCGCTCCAGAGACACAGCTACAACTACTCTCAGTACTGCAGCATGGCAGCG
M A A
320 340 360 380 400
GGAAACACTTACTCGGAAGAGGTAATAAAGCTACCAACTGGCTTCAAGATAATGCTCAAAAAGAAGCATTCTTTATGTATTTAAACACAAAAAGTCA
G N T Y S E E V L K A T N W L Q D N A Q K E A F S Y V F K T Q K V N
A 420 440 460 480 500
ATCTGAATGGAAAAGAAATTGCTTGGAAATACTACAACAAAGATACAACAGATGCGGAAATGATAAACCACAAAGAGGAGCAGAAACATCATGGGACCA
L N G K E I A W N N Y N K D T T D A E M I N L Q R G A E T S W D Q
520 *Taq*I C540 ▼h *Sca*I560 580 600
GGCAACAGACATGGAATGGGAATCAGAAATCGACAGTCTCACAACCGGCAAGTACTGATTTTTGACTCTCTTGTTAAAAATGTCTCTTTGAAGGTATA
A T D M E W E S E I D S L T K R Q V L I F D S L V K K C L F E G I
620 640 660 680 700
TTGCAAAAGAACCTAAGTCCAAGTACTGCTACTGGTTCATACAGCATGAACATGGTCAAGATACTGGCTATCACTGCCATGTACTACTAGTGGAAAAG
L Q K N L S P S D C Y W F I Q H E H G Q D T [G Y H C H V L L G] G K G
720 740 760 780 800
GCTTACAACAAGCAATGGGAAAATGGTTCAGAAAACAATTAACAATTTATGGAGTAGATGGTTAATAATGCAATGCAAAGTACCTCTAACACCAGTTGA
L Q Q A M G K W F R K Q L N N L W S R W L I M Q C K V P L T P V E
p 820 840 860 880 900
AAGAAATAAAATTAAGGGAATTAGCAGAGGATGGTGAAGTGGGTATCGCTACTAACCTACACTCACAACAAACTAAAAACAATATACAAAAATGACTCAT
R I K L R E L A E D G E W V S [L L T Y T H K Q T K] K Q Y T K M T H
920 p 940 960 980 1000
TTTGAAATATGATTGCTTACTACTTCTCTAAATAAAAAAGAAAGACAACACTGAAAGAGAGCATGGATATTATCTCAGCTCAGATTCTGGCTTCATGACAA
F G N M I A Y Y F L N K K R K T T E R E H G Y Y L S S D S G F M T N
1020 1040 p 1060 1080 1100
ATTTCTTAAAGAAGGCGAGAGACACTTAGTCAGTCACTATTTACTGAAGCAATAAACTGAAACTGTGGAAACAACGGTTACTACAGCTCAGGAAGC
F L K E G E R H L V S H L F T E A N K P E T V E T T V T T A Q E A
1120 1140 1160 p 1180 1200
CAAAAGAGGCAGAAATACAAACAAAAAAGAAGTAAGCATAAATGCACAATAAGAGACTTGGTTAATAAAAGATGTACTAGCATAGAAGACTGGATGATG
K R G R I Q T K K E V S I K C T I R D L V N K R C T S I E D W M M
1220 1240 1260 1280 1300
ACAGATCCAGACAGTTATATAGAAATGATGGCTCAAACCGGAGGAGAAAATTAATCAAAAATACACTAGAAATAACAACCTTACTCTAGCAAGAACAA
T D P D S Y I E M M A Q T G G E N L I K N T L E I T T L T L A R T K
1320 1340 *sph*I 1360 1380 *sph*I 1400
AAACAGCATATGACTTAATACTTGAAAAGGCAAAACCAAGCATGCTACCAACATTTAATATTAGCAATACAAGAACATGTAATAATTCAGCATGCACAA
T A Y D L I L E K A K P S M L P T F N I S N T R T C K I F S M H N
1420 1440 1460 1480 1500
TTGGAACATATTAAGTCTGCCATGCTATACTTGTGACTAAACAGACAAGGAGGAAAAAGAAATACAATTCTATTTATGGGCCAGCATCAACAGGA
W N Y I K V C H A I T C V L N R Q G G K R N T [I L F H G P A S T G]
1520 A 1540 1560 1580 p 1600
AAAAGTATAATTGCTCAACACATTGCAAACCTGGTTGGTAATGTTGGTGTCTACAATGCAGCCAATGTGAACCTTCCATTTAATGACTGTACAATAAAA
K S I I A Q H I A N L] V G N V G C Y N A A N V N F P F N D C T N K [N
1620 1640 1660 1680 1700
ACTTAATATGGATTGAAGAAGCAGGAACTTCTCTAACCAAGTAAACCAATTCAAAGCCATATGTTCAAGTCAAAACAATTAGAATTGACCAAAAAGGTAA
L I W I E E A G N] F S N Q V N Q F K A I C S G Q T I R I D Q K G K

1720 1740 1760 1780 1800
 AGGAAGCAAACAAATGAACCAACTCCTGTAATAATGACTACAAATGAAGACATAACTAAAGTTAGAATAGGATGCGAGGAAAGACCAGAACATACACAA
 G S K Q I E P [T P V I M T T N E] D I T K V R I G C E E R P E H T Q

1820 1840 1860 *Ba/I* { 1900
 CCAATAAGAGACAGAATGTTAAACATAAACCTAACCAAGAAAAGTCCAGGTGATTTTGGACTTTTAGAAGAAACTGAATGGCCACTAATATGTGCTTGGT
 P I R D R M L N I N L T R K L P G D F G L L E E T E W P L I C A W L

*BstEII*1920 *NheI* } 1940 i 1960 k A 1980 j 2000
 TGGTAAAGAAAGTTACCAAGCAACAATGGCTAGCTATATGCATCATTGGGAAATGTACCTGATTGGTCCGAAAAATGGGAGGAGCCAAAAATGCAAAC
 V K K G Y Q A T M A S Y M H H W G N V P D W S E K W E E P K M Q T

p 1 ▼m 2040 2060 2080 2100
 CCAATAAATACACCAACAGACTCTCAGATTTCCACATCAGTGAAAACCTTCGCCAGCGGACAACAACCTACGAGCAACTCCAATACAGGAGGACCTGGAT
 P I N T P T D S Q I S T S V K T S P A D N N Y A A T P I Q E D L D
 L S D F H I S E N F A S G Q Q L R S N S N T G G P G F

2120 2140 2160 2180 2200
 TTAGCTTTAGCCTTGGAGCGTGGAGCGAGCCAACAACCAACTTTCCACCACTGCCTTAACCTCAACACCGCCAGATTGAGCAATACGGACACCAA
 L A L A L E P W S E P T T P T F T N L H L T P T P P D S A I R T P S
 S F S L G A V E R A N N T N F H Q P A L N S N T A R F S N T D T K

XcmI 2220 2240 2260 t ▼o q *NarI* 2300
 GTCCAACCTTGGTCCGAAATAGAAACCGACATAAGAGCCTGCTTTGGTAAAACTGTGCACCCACAACAACCTTGAATAAGGTAGGATGGCGCTCTCTCG
 P T W S E I E T D I R A C F G E N C A P T T N L E - M A P P A
 S N L V G N R N R H K S L L W -

r▼ 2320 2340 2360 2380 ▼s 2400
 AAAAAGAGCAAGAGGTAAGGGTAGTTTAAAGGGGTGGTGGGCATACATATAAACTAACTGCAAATAATTTTTTTATATATTACAGGACTAACTCTACC
 K R A R G T N S T
 L T L P

2420 2440 t 2460 2480 2500
 AGGATACAAATACCTTGGTCCAGGAACTCACTAGACCAAGGAGAACCAACTAAATCCATCAGACGCCGAGCAAAGAACACGACGAAGCCTACGACAAA
 R I Q I P W S R K L T R P R R T N -
 G Y K Y L G P G N S L D Q G E P T N P S D A A A K E H D E A Y D K

2520 2540 *PvuII* 2560 2580 2600
 TACATAAAATCTGGAAAAATCCATACTTCTACTTCTCAGCAGCTGATGAAAAATTCATAAAAGAACTGAACACGCAAAAGACTACGGAGGTAAATTTG
 Y I K S G K N P Y F Y F S A A D E K F I K E T E H A K D Y G G K I G

2620 2640 2660 2680 2700
 GACATTACTTCTCAGAGCAAAGCGTGCCTTTGCTCCAAAACCTCAGAAAACAGACTCACCACTACATCTCAACAACAGAGGTAAGAAGATCGCCGAG
 H Y F F R A K R A F A P K L S E T D S P T T S Q Q P E V R R S P R

2720 2740 2760 2780 2800
 AAAACACCCAGGGTCTAAACCACAGGAAAAAGACCTGCTCCAAGACATATTTTATAAACTTAGCTAAAAAAAAGCTAAAGGGACATCTAATACAAAC
 K H P G S K P P G K R P A P R H I F I N L A K K K A K G T S N T N

u 2820 2840 2860 2880 2900
 TCTAACTCAATGAGTAAAAATGTGGAACAACCAACCCTATTAATGCAGGCACTGAATTGTCTGCAACAGGAAATGAATCTGGGGGTGGGGGCGCGGGT
 S N S M S E N V E Q H N P I N A G T E L S A T G N E S G G G G G G G

2920 2940 c 2960 2980 3000
 GCGGGGTAGGGGTGCTGGGGGGTGGTGTGTCTACAGGTAGTTTCAATAATCAAACAGAAATTTCAATACTTGGGGGAGGGCTTGGTTAGAATCACTGC
 G G R G A G G V G V S T G S (T) F N N Q T E F Q Y L G E G L V R I T A

3020 3040 3060 3080 3100
 ACACGCATCAAGACTCATACTATAATGCCAGAACAGAAACATACAAAAGAATACATGTACTAAATTCAGAATCAGGGGTGGCGGGACAAATGGTA
 H A S R L I H L N M P E H E T Y K R I H V L N S E S G V A G Q M V

3120 3140 3160 A 3180 *BstXI* 3200
 CAAGACGATGCACACACAAATGGTAACACCTTGGTCACTAATAGATGCTAACGCATGGGGGGTGGTTCATCCAGCGGACTGGCAGTTAATATCCA
 Q D D A H T Q M V T P W S L I D A N A W G V W F N P A D W Q L I S N

p 3220 3240 *SspI* *ScaI* 3260 3280 3300
 ACAACATGACAGAAATAACTTAGTTAGTTTTGAACAAGAAATATTCATGTAGTACTTAAAACAATTACAGAATCAGCAACCTCACCACCAACCAAAAT
 N M T E I N L V S F E Q E I F N V V L K T I T E S A T S P P T K I

3320 *HindIII* 3340 3360 3380 3400
 ATATAATAATGATCTAACTGCAAGCTTAATGGTCGCACCTAGACACCAATAACACACTTCCATACACACCAGCAGCACCTAGAAGTGAAACACTTGGTTTT
 Y N N D L T A S L M V A L D T N N T L P Y T P A A P R S E T L G F

T *NcoI* *BstEII* 3420 3440 T 3460 3480 3500
 TACCCATGGTTACCTACAAAACCAACTCAATACAGATATTACCTATCATGCACCAGAAAACCTAAATCCACCAACATACACTGGACAATCACAAACAAATAA
 Y P W L P T K P T Q Y R Y Y L S C T(I)R N L N P P T Y T G Q S Q Q I T

3520 3540 3560 3580 *EcoRI* 3600
 CAGACTCAATACAAACAGGACTACACAGTGACATTATGTTCTACACAATAGAAAATGCAGTACCAATTCATCTTCTAAGAACAGGAGATGAATTCTCCAC
 D S I Q T G L H S D I M F Y T I E N A V P I H L L R T G D E F S T

3620 3640 *BglII* 3660 3680 3700
 AGGAATATATCACTTTGACACAAAACCACTAAAATTAACTCACTCATGGCAAACAACAGATCTCTAGGACTGCCTCCAAAACCTACTAACTGAACCTACC
 G I Y H F D T K P L K L T H S W Q T N R S L G L P P K L L T E P T

3720 3740 3760 3780 3800
 ACAGAAGGAGACCAACCCAGGAACACTACCAGCAGCTAACACAAGAAAAGTTATCACCAAAACAATTAATAATAGCTACACAGAAGCAACAGCAATTA
 T E G D Q H P G T L P A A N T R K G Y H Q T I N N S Y T E A T A I R

3820 3840 3860 3880 3900
 GGCCAGCTCAGGTAGGATATAAATACCCATACATGAATTTTGAATACTCCAATGGTGGACCATTTCTAACTCCTATAGTACCAACAGCAGACACACAATA
 P A Q V G Y N T P Y M N F E Y S N G G P F L T P I V P T A D T Q Y

3920 3940 A C 3980 4000
 TAATGATGATGAACCAAATGGTGCTATAAGATTTACAATGGGTTACCAACATGGACAATTAACCACATCTTCACAAGAGCTAGAAAGATACACATTTCAAT
 N D D E P N G A I R F T M G(D)Y Q H G Q(H)L T T S S Q E L E R Y T F N

4020 *SstI* 4040 4060 4080 4100
 CCACAAAGTAAATGTGGAAGAGCTCCAAGCAACAATTTAATCAACAGGCACCACTAAACCTAGAAAATACAATAATGGAACACTTTTACCTCAGATC
 P Q S K C G R A P K Q Q F N Q Q A P L N L E N T N N G T L L P S D P

T 4120 4140 4160 4180 4200
 CAATAGGAGGGAAACCTAACATGCATTTTCATGAATACACTCAATACATATGGACCATTAACAGCACTAAACAATACTGCACCTGTATTTCCAATGGTCA
 I G G K P(S)N M H F M N T L N T Y G P L T A L N N T A P V F P N G Q

4220 *BglII* 4240 4260 4280 4300
 AATATGGGATAAAGAAGCTTGATACAGATCTAAAACCTAGACTACATGTTACAGCTCCATTTGTTTGTAAAAACAATCCACCAGGACAACCTATTTGTAAAA
 I W D K E L D T D L K P R L H V T A P F V C K N N P P G Q L F V K

4320 4340 4360 4380 4400
 ATAGCACCAAACCTAACAGATGATTTCAATGCTGACTCTCCTCAACAACCTAGAATAATAACTTATTCAAACCTTTTGGTGGAAAGGAACACTAACATTCA
 I A P N L T D D F N A D S P Q Q P R I I T Y S N F W W K G T L T F T

4420 4440 4460 4480 4500
 CAGCAAAAATGAGATCCAGTAATATGTGGAACCTATTCAACAACACACAACAACAGCAGAAAAACATTGGTAACTATATTCTACAAAATATTGGTGGCAT
 A K M R S S N M W N P I Q Q H T T T A E N I G N Y I P T N I G G I

G 4520 4540 † t 4560 p 4580 4600
 AAAAAATGTTCCAGAATATTACAACCTTATACCAAGAAAATTATACTAGAAAATAACTCTGTAATAAAACTCAGTTACTTGGTTAATCATGTACTACTA
 K M F P E Y S Q L I P R K L Y -

p 4620 p 4640 p c † 4680 p 4700
 TCATTGTATACTTCAATAAAAAATAAATTGTAATAATCAATAAAACTAAGTTACTTAGTTTATGTATACCAATTATCCCCAAAAACAATAAAATTTTAAAA

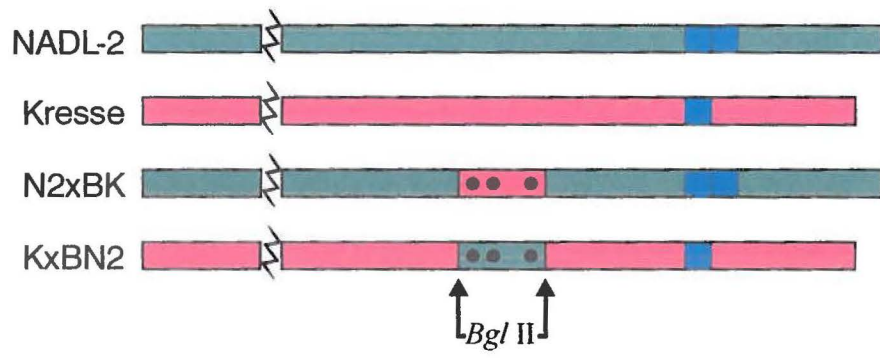
4720 <> 4740 4760 4780 4800
 AGAAAACAAGCTCTCATGTGTTTACTATTAACCTAAACCAACCACTTATATGACCTTATGTCTTTAGGGTGGGTGGGGAATTACTATGTATTCTTT

4820 4840 4880 4900
 GAGTTAGTTGGTCGCCTTTGGGCGACTAACCAAGCGGCTCTGCCGCTTGGTTAGTCGCACGGCGACCAACTAACTCAAAGGAATACATAGTAATCCAC

4920 4940 <>
 CCACCCACCCTAAAGACATAAGGTCATATAAGTGTGGTTGGTTAGTT

Fig. 2. Sequences of PPV field isolates in the genome region where coding sequence differences between the Kresse and NADL-2 strains are located. The position noted in the NADL-2 sequence is that of the affected base in the codon coding for the amino acid on the same line. Typical vaccine-like isolates had the sequence shown for NADL-2 and contained a 127-bp repeat. One exception was IAF-3, a vaccine-like isolate from mummified tissues, which lacked the repeat. The 90HS (a virulent strain) sequence is that published by Sakurai *et al* (27). IAF-22, IAF-28, and IAF-76 are virulent PPV strains which differ only slightly from 90HS. In this sequence, IAF-28 contained only the consistent point mutations (with respect to NADL-2) whereas others, such as IAF-76, contained additional point mutations that were not consistent among virulent strains. The dermatitis strain, Kresse, had the same sequence, in this region, as the abortion-causing IAF-28 strain and the dermatitis determinant should be located elsewhere. nd, not determined.

Fig. 3. Construction of chimeric clones of PPV. The *Bgl*III fragments of PPV Kresse and NADL-2 were exchanged in the opposite background. The critical amino acid positions are indicated. These infectious clones were transfected into PT cells, and then their titers (50% tissue culture infective dose [TCID₅₀]) in PT, PFT and TV cells were determined.

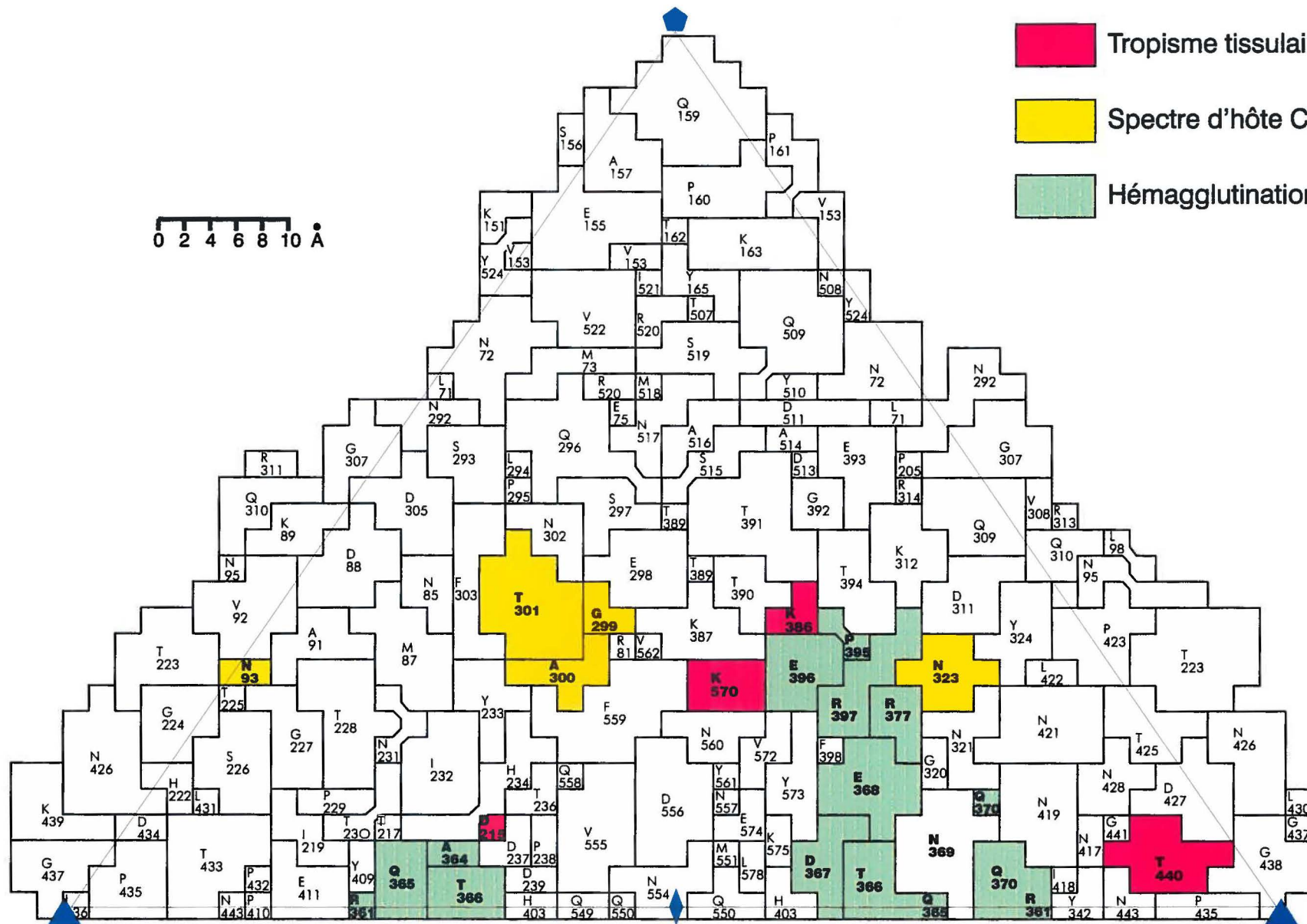


	TCID ₅₀ /mL	
	TV cells	PT cells
NADL-2	10 ^{4.55}	10 ^{8.05}
Kresse	0	10 ^{4.8}
N2xBK	0	10 ^{9.43}
KxBN2	10 ^{4.55}	10 ^{6.43}

Fig. 4. Modified roadmap of CPV showing a projection of solvent accessible surface amino acids for one asymmetric unit of the icosahedral particle. CPV residues involved in host range (medium shading) or in hemagglutination (HA [light shading]) are indicated. Residues putatively involved in the host range are also indicated. The CPV / PPV amino acid correspondance is as follows (VP2 numbering): 215-215, 381-378 (below the surface), 386-383, 440-436 and 570-565. The radial distance of the surface residues from the capsid center is shown at the top left ($1 \text{ \AA} = 0.1 \text{ nm}$). The figure was produced in part by the software application Roadmap (7).

- Tropisme tissulaire PPV
- Spectre d'hôte CPV
- Hémagglutination CPV

0 2 4 6 8 10 Å



Chapitre 2

CHAPITRE 2 ÉTAPES PRÉCOCES DE L'INFECTION *IN VITRO*

Avant-propos

Contrairement aux adénovirus (Greber *et al*, 1993), les mécanismes qui régissent l'internalisation des parvovirus sont encore inconnus bien que certaines molécules membranaires permettant l'attachement aient été identifiées. C'est le cas du globoside, un glycosphingolipide, pour le parvovirus B19 (Brown *et al*, 1993) ou encore d'une protéine membranaire d'environ 40 kDa pour CPV (Basak *et al*, 1994). Dans le cas du PPV, un anticorps monoclonal pouvant se lier à une molécule membranaire d'environ 40 kDa et pouvant inhiber l'attachement de façon compétitive a été utilisé pour démontrer l'importance de cette première étape du cycle infectieux (Harding et Molitor, 1992). Il est important de noter que ce phénomène est observé autant chez les cellules permissives que non-permissives.

Nos travaux présentés précédemment ont démontré l'importance de la capside du PPV dans le tropisme cellulaire. Par ailleurs, certains travaux suggèrent que la permissivité cellulaire aux infections par la majorité des parvovirus ne dépend pas nécessairement des récepteurs cellulaires associés à la membrane mais plutôt que les mécanismes régissant le tropisme sont subséquents à l'étape d'internalisation, principalement parce que l'efficacité de celle-ci ne diffère pas entre les cellules permissives et non-permissives (Ridpath et Mengeling, 1988; Basak et Turner, 1992; Oraveerakul *et al*, 1992). Il est donc proposé que les étapes initiales suivant l'internalisation soient cruciales pour l'infection et que des facteurs intracellulaires agissent à ce niveau (Basak et Turner, 1992; Vihinen-Ranta *et al*, 1998).

Afin de comprendre l'entrée du parvovirus porcin chez diverses cellules, nous avons entrepris une caractérisation préliminaire des étapes initiales de l'infection en étudiant la distribution des particules virales lors de l'entrée dans différentes lignées cellulaires.

Nos résultats confirment que les particules virales peuvent pénétrer dans des cellules non permissives tel que démontré par d'autres groupes. Par contre, nos résultats suggèrent que le lieu d'accumulation des particules virales internalisées varie selon les lignées cellulaires et que divers mécanismes de régulation du transport des particules existent car des différences importantes ont été observées entre les cellules non permissives.

INTRODUCTION

Alors que les différences causant un changement de tropisme cellulaire *in vitro* ont été étudiées chez les souches non pathogéniques et pathogéniques du parvovirus porcin, l'étape de l'infection où ces différences prennent leur importance demeure encore inconnue. Certains travaux des dernières années permettent de postuler que les étapes initiales de transport des particules à l'intérieur de la cellule et leur localisation sub-cellulaire ont un impact majeur sur la progression du cycle viral lors de l'infection (Basak et Turner, 1992; Basak et Turner, 1992; Vihinen-Ranta *et al*, 1998). Des résultats récents suggèrent que des changements mineurs de conformation des boucles de surface du CPV peuvent survenir au niveau des endosomes, là même où une baisse importante de pH (environ pH 5,5) est observée. Cette étape permettrait d'amorcer la décapsidation des particules ou l'interaction avec de nouvelles composantes cellulaires (Simpson *et al.*, en préparation).

Le transport intracellulaire des particules virales, en plus d'être important pour diriger les particules vers les endosomes, doit intervenir dans des étapes subséquentes afin de permettre au génome d'être éventuellement libéré au niveau du noyau de la cellule. Par contre, les mécanismes permettant au virus de compléter cette étape de son cycle viral demeurent encore inconnus.

Nos travaux antérieurs à l'aide de cultures primaires de testicules de veaux ont permis de différencier les souches non pathogéniques des pathogéniques. De plus, nous avons utilisé des lignées cellulaires permissives ou non permissives au PPV. Bien que les résultats obtenus à l'aide de ces systèmes cellulaires soient reproductibles, les mécanismes sous-jacents permettant d'observer ces phénotypes *in vitro* sont inconnus.

Afin d'orienter nos travaux futurs, nous devons déterminer quelle étape précoce de l'infection jouait un rôle pivot. Nous avons entrepris d'étudier la distribution des particules virales internalisées chez diverses populations cellulaires.

Nos résultats présentés ici suggèrent que deux étapes de transport des particules interviennent dans le cycle viral: une première étape de transport vers des endosomes suivie d'une deuxième vers le noyau. Nos résultats suggèrent également que le transport vers le noyau peut être effectué dans certains cas sans que la première étape endosomale n'ait été effectuée. Par contre, le transport vers le noyau ne permet pas de rendre une infection productive chez les cellules non permissives, ce qui suggère que la première étape est cruciale dans le cycle viral ou bien que le facteur limitant demeure l'accessibilité à des facteurs cellulaires que l'on retrouve seulement dans certaines lignées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Culture cellulaire et infections

Les lignées cellulaires utilisées (PT, PFT, MDCK, CRFK, MDBK et PK15) ont été maintenues dans du milieu D-MEM (high glucose; Gibco BRL) avec 6-8% d'un mélange 1:1 de sérum fœtal bovin et de milieu fortifié Cosmic Calf Serum (HyClone) ainsi que des antibiotiques dans une atmosphère humide avec 5% CO₂ à 37°C. Les cultures primaires de testicules de veaux (TV) ont été obtenues du Service de diagnostic du MAPAQ à l'Institut Armand-Frappier. Les cellules ont été stabilisées par deux passages successifs puis utilisées pendant les trois passages suivants pour des infections. Les infections (pour tous les types cellulaires utilisés) ont été effectuées à 40-50% de confluence en présence de 8% du mélange de sérum dans des plateaux de 96 puits (initialement à 10⁴ cellules/puit) ou dans des lames Labteks (Nunc) à 2 ou 8 chambres. Les infections ont été effectuées à une MOI située entre 10 et 20 pour les expériences en immunofluorescence.

Stocks de virus

Les stocks de virus ont été produits sur cellules PT ou PFT à une MOI de 0.1-1 afin d'éviter l'accumulation de particules défectives ou vides (sans génome). Les surnageants ont été clarifiés à 2000 x g pendant 5 minutes puis conservés à 4°C.

Transfections

Les transfections ont été effectuées à l'aide des réactifs SuperFect (Qiagen) ou Effectene (Qiagen) selon les directives du fabricant. L'ADN utilisé provenait soit de maxipreps ou midipreps préparés avec une trousse de purification de plasmide de Qiagen. Le protocole du manufacturier a été modifié à l'étape de précipitation à l'isopropanol pour être effectué dans une série de microtubes stériles de 0,5mL. Une fois l'ADN précipité, il a été lavé à deux reprises avec de l'éthanol à 70% filtré à 0,2 μ m (IBI Kodak) puis séché à l'air libre sous une hotte à flot laminaire et conservé sec à -20°C jusqu'à utilisation. Un contrôle de transfection (pQBI50, Quantum Biotechnologies) a été utilisé afin de s'assurer de l'efficacité de transfection.

Immunofluorescence

Les cellules ont été fixées au temps voulu (6, 12, 24, 48 heures post-infection) à l'aide d'une solution méthanol:acétone (1:1) conservée à -20°C. Le surnageant des plateaux ou des lames était enlevé, les feuillets cellulaires étaient rincés avec du PBS (20°C) puis fixés pendant 1 minute à température ambiante, le tout suivi de deux étapes de fixation de 10 minutes chacune à -20°C.

Pour l'immunofluorescence, les cellules étaient réhydratées avec du PBS (20°C) pendant 5 minutes. Le tampon était ensuite remplacé par une solution de blocage (PBS; 5% sérum) pendant 30 minutes. Le premier anticorps utilisé est issu du surnageant de culture de l'hybridome 3C9-D11-H11 (ATCC) reconnaissant les capsides de PPV à une dilution de 1/100 - 1/200. Ce premier anticorps était incubé pendant 30 minutes dans une atmosphère humide à température de la pièce avec agitation toutes les 5 minutes. Après plusieurs lavages avec du PBS, le deuxième anticorps conjugué à la fluorescéine était incubé à une dilution de 1/80, dans les mêmes conditions, puis lavé avec du PBS. Le deuxième anticorps est un sérum polyclonal de lapin anti-IgG de souris couplé et purifié selon les méthodes courantes.

Test d'hémagglutination

Les hématies de cobayes ont été prélevées par ponction du sinus orbital et recueillies dans une solution Alsever (Centre de biologie expérimentale, Institut Armand-Frappier). Sur réception, les globules ont été rincés à trois reprises avec du PBS et conservés pour un maximum de 4 jours à 4°C. La solution de travail était constituée de globules à 0,45% (v/v) dans du PBS contenant 0,5% BSA. Le test d'hémagglutination était effectué dans des plateaux de 96 puits à fond rond (Falcon) en présence de 100µL de solution 0,45% de globules rouges de cobayes et 50µL de solution à tester. Les plateaux étaient recouverts d'un couvercle puis laissés à température de la pièce sur une surface tapissée de papier essuie-main imbibé d'eau afin de prévenir l'adhérence électrostatique au plastique. Après que les globules des cupules contrôle négatifs se soient déposés au fond, les plateaux étaient inclinés pour en faire la lecture.

RÉSULTATS

Permissivité de différentes lignées cellulaires

Diverses lignées cellulaires ont été soit infectées avec des stocks de PPV ou transfectées avec un clone infectieux de PPV. La production de virus suite aux infections ou aux transfections a été mesurée par un test d'hémagglutination (Tableau 1). Nos résultats montrent que la permissivité ne peut être modifiée seulement que par la transfection d'un clone infectieux. La production de PPV suite à l'infection et la transfection des cellules MDBK et CRFK n'a pu être démontrée, même avec la souche Kresse ou son clone infectieux. Tel que décrit préalablement, la transfection des cellules primaires TV avec la souche Kresse, tout comme l'infection, ne permet pas de récupérer des particules virales détectables par hémagglutination.

Localisation cellulaire des particules virales

Les mêmes lignées cellulaires ont été utilisées afin de déterminer la localisation cellulaire des protéines de la capsid virale par immunofluorescence après 6, 12, 24, 36 ou 48 heures post-infection (Tableau 2). Les protéines de capsid sont détectées très rapidement (<8 heures),

presque exclusivement dans le noyau des cellules PT et PFT, et ce niveau augmente dans les premiers 48 heures post-infection. Par contre, les nucléoles des cellules PT infectées par le PPV sont normalement caractérisés par l'absence de fluorescence (Figure 1) alors que le niveau de fluorescence est aussi grand dans les nucléoles des cellules PFT infectées. Les cellules PK15 démontrent également un patron de fluorescence nucléaire typique des cellules infectées par le PPV.

Une très faible proportion des cellules non permissives possède un noyau où les protéines de capsid du PPV peuvent être identifiées. Une minorité (< 2%) des cellules MDBK possèdent un faible niveau de fluorescence nucléaire alors que les cellules CRFK sont principalement négatives au niveau intranucléaire. Lorsque celles-ci sont observées 6 heures post-infection, un grand nombre de cellules démontrent une fluorescence intense, exclusivement périnucléaire alors que ce nombre diminue considérablement (<5%) après 24 heures post-infection.

Le cas des cellules TV transformées (Laakel *et al.*, non publié) est plus particulier. Ces cellules sont mitotiquement très actives et produisent des titres importants de virus. Par contre, une très grande proportion des cellules observées possède un niveau de fluorescence intense au niveau du cytoplasme.

Distribution cellulaire de différentes souches de PPV chez les cellules TV

Afin de caractériser les cellules TV, nous avons procédé de deux façons, soit par transfection ou par infection à l'aide de différentes souches ou chimères. Nos résultats démontrent que la transfection de la souche Kresse ou encore de la chimère N2xBK (Figure 2) est peu efficace mais que néanmoins, quelques cellules peuvent permettre la synthèse des protéines de capsid. Le niveau basal de fluorescence est plus élevé afin de faire ressortir le signal relativement peu élevé rencontré à quelques reprises dans ce cas. Par contre, la transfection de la souche NADL-2 ou encore de la chimère KxBN2 permet d'obtenir un plus grand nombre de cellules où les protéines de capsides sont détectées (Figure 3).

Lorsque les mêmes cellules sont mises en contact avec les différentes souches, des résultats similaires sont obtenus. Par contre, l'observation des cellules TV soit 24h ou 48h post-infection permet d'observer des différences dans les patrons de fluorescence (Figure 4) alors qu'à 8 et 12 heures post-infection, la majorité des particules virales sont localisées près de la membrane (non-illustré).

Dans le cas de la souche NADL-2, les cellules TV sont permissives et nous pouvons observer qu'à 24 heures post-infection (non-illustré), les cellules infectées possèdent une fluorescence majoritairement nucléaire alors qu'à 48 heures, la fluorescence est autant cytoplasmique que nucléaire (Figure 4a). Dans le cas de la chimère N2xBK, aucune fluorescence spécifique n'est détectée alors que sa contrepartie, la chimère KxBN2 possède des caractéristiques similaires à la souche NADL-2. En fait, les niveaux de fluorescence détectés sont encore plus élevés (Figure 4 c-e). L'accumulation de fluorescence à 48h se situe principalement dans des vésicules cytoplasmiques encore non identifiées.

DISCUSSION

Le tropisme cellulaire des parvovirus est régulé par la structure de la capsid. Nos travaux antérieurs ont démontré l'importance de certains résidus de la capsid dans le tropisme cellulaire *in vitro* (Bergeron *et al*, 1996). L'internalisation des particules virales peut être responsable du déclenchement irréversible de la décapsidation (Greber *et al*, 1993). Étant donné que dans plusieurs cas, les parvovirus peuvent pénétrer autant dans des cellules non permissives que dans des cellules permissives, une étape subséquente à l'entrée des particules doit être responsable de déclencher l'infection productive.

La permissivité de différentes lignées cellulaires a été étudiée par le groupe de Molitor (Oraveerakul *et al*, 1992). Leurs résultats confirment que le PPV se lie aussi bien (en nombre) aux cellules permissives que non permissives. Par contre, leurs résultats ne démontrent pas

si l'internalisation est aussi efficace dans les deux cas. De plus, le nombre de "récepteurs" sur chaque type cellulaire utilisé n'a pas été comparé. Leurs résultats indiquent également que les cellules MDCK ne permettent pas la production de particules virales ni de protéines de capsidite détectables en immunofluorescence. Par contre, ils détectent la présence de formes répliquatives virales suggérant du moins qu'une proportion des particules virales pénétrant dans la cellule peut "livrer" son génome au noyau. Ils suggèrent qu'une faible proportion des cellules permet la répllication virale à un taux très bas et que l'accumulation de génome n'est pas suffisante pour produire un nombre détectable de protéines virales. Il s'agirait donc ici d'un blocage au niveau de la transcription ou de la traduction et non pas un blocage au niveau de l'internalisation, de la décapsidation ou encore de la formation des capsides.

Nos travaux avaient pour but de détecter la présence de protéines de la capsidite par immunofluorescence ou de mesurer la production de virus par HA. Par transfection de clones infectieux de PPV dans des cellules non permissives, il nous a été impossible de détecter la production de capsides alors que les cellules permissives permettaient la détection de particules virales par hémagglutination ainsi que des protéines de capsidite par immunofluorescence. Par contre, les travaux de Molitor *et al* suggèrent que les cellules MDBK sont permissives alors que même par transfection, nous n'avons jamais détecté la présence de protéines de capsides par immunofluorescence. Afin d'éliminer la possibilité que la souche utilisée soit en fait un sous clone non permissif, nous avons même obtenu des cellules MDBK de deux sources. La provenance des cellules MDBK ayant été utilisées par l'autre groupe pourrait ainsi être en cause.

L'étape d'internalisation des particules virales est relativement rapide (Vihinen-Ranta *et al*, 1998). Étant donné que des protéines de capsidite peuvent être détectées 24 et même 48 heures post-infection dans certains cas chez des cellules non permissives, les protéines persistent donc dans les cellules sans être dégradées ou alors de nouvelles protéines sont synthétisées, même à un niveau faible. Nos résultats ne permettent malheureusement pas de distinguer entre les deux possibilités principalement parce que l'anticorps monoclonal utilisé reconnaît aussi bien les particules virales intactes que les protéines de capsides sous forme

monomérique. Afin de distinguer entre les deux, c'est-à-dire les particules virales et les protéines produites, il serait possible d'utiliser des capsides vides recombinantes, celles-ci ayant une internalisation tout aussi efficace. Néanmoins, il semble que nos résultats diffèrent légèrement de ceux du groupe de Molitor à ce niveau.

Alors que les lignées cellulaires permissives présentent un patron de fluorescence presque exclusivement nucléaire et rarement cytoplasmique, les résultats obtenus avec les cultures primaires de testicules de veaux confirment qu'il s'agit d'une population hétérogène de cellules étant donné que plusieurs cellules montrent une fluorescence importante au niveau du cytoplasme, autant lors de la transfection que de l'infection. Cette fluorescence se distingue des patrons associés aux particules prises dans une étape d'internalisation où des structures analogues aux endosomes sont marquées. L'hétérogénéité cellulaire rencontrée ici est problématique si nous désirons avoir un système cellulaire infallible permettant de distinguer le potentiel pathogène des souches virales. Nos résultats démontrent que l'accumulation des particules virales chez ces cellules concorde néanmoins avec les résultats obtenus au préalable (Bergeron *et al*, 1996). Tel que démontré dans cette publication, l'infection des cellules primaires TV ne permet de récupérer des particules infectieuses que dans le cas de souches ayant un profil similaire aux souches vaccinales. Par contre, autant par infection que par transfection de souches ou chimères de profil pathogénique, il est possible de détecter un signal faible indiquant la présence de protéines de capsides dans une minorité de cellules. Ce signal, contrairement à celui détecté de souches non pathogéniques, diminue graduellement après 24 heures post-infection ou post-transfection. De plus, le pourcentage de cellules permissives est faible ce qui explique les titres viraux relativement faibles obtenus avec ces cellules (Bergeron *et al*, 1996).

Dans les quelques cellules où l'accumulation de particules virales peut être observée indirectement par immunofluorescence, il semble que les particules soient conscrées dans un type de vésicule bien défini au lieu d'être dispersées dans le cytoplasme. Il s'agit probablement d'endosomes bien que des expériences de co-localisation n'aient pas été effectuées. Ces observations suggèrent que les étapes menant à la production de particules virales sont

effectuées différemment dans ces cellules ou encore qu'elles présentent un blocage dans le transport intracellulaire. Étant donné que ces structures transitoires ne sont jamais observées dans les lignées permissives, il est également probable que les cellules TV possèdent une activité métabolique et mitotique moins intense, ce qui pourrait expliquer ces observations.

Le problème d'hétérogénéité des cultures primaires de testicules de veaux peut être résolu par l'utilisation de populations uniformes de cellules transformées et clonées par la suite. Des travaux préliminaires confirment nos résultats par l'identification de clones cellulaires ayant des phénotypes différents (Laakel *et al.*, en préparation).

Tableau 1 . Détection de la production de PPV par hémagglutination

Lignée cellulaire	Transfection				Infection			
	Nadl-2	Kresse	KxBN2	N2xBK	Nadl-2	Kresse	KxBN2	N2xBK
PT	1/128	1/256	1/256	1/128	1/512	1/256	1/1024	1/256
PFT	1/128	1/128	1/256	1/64	1/128	1/512	1/1024	1/256
TV	1/32	0	1/64	0	1/64	0	1/128	0

Tableau 2. Localisation cellulaire des protéines de capsid de PPV

Lignée cellulaire	Localisation cellulaire des protéines de capsides
PT	Fluorescence nucléaire en moins de 8 h post-infection. Fluorescence cytoplasmique seulement dans les cellules dégénérées
PFT	Fluorescence nucléaire en moins de 8 h post-infection. Nucléoles brillants contrairement au cellules PT.
TV	Fluorescence nucléaire ou cytoplasmique selon les cellules. Beaucoup d'hétérogénéité.
PK15	Fluorescence nucléaire; nucléoles brillants
MDCK	Moins de 1% de cellules positives, un peu de fluorescence périplasmique résiduelle jusqu'à 36h post-infection
MDBK	Fluorescence nucléaire; Moins de 1% de cellules positives
CRFK	Fluorescence périnucléaire; nombre de cellules ayant une forte fluorescence périnucléaire après 24h diminue (<5%)

Figure 1 Fluorescence nucléaire observée chez les cellules PT, 24h post-infection.
Les antigènes viraux sont localisés dans les noyaux mais les nucléoles sont majoritairement négatifs. Les cellules d'un ton plus jaune sont surexposées.

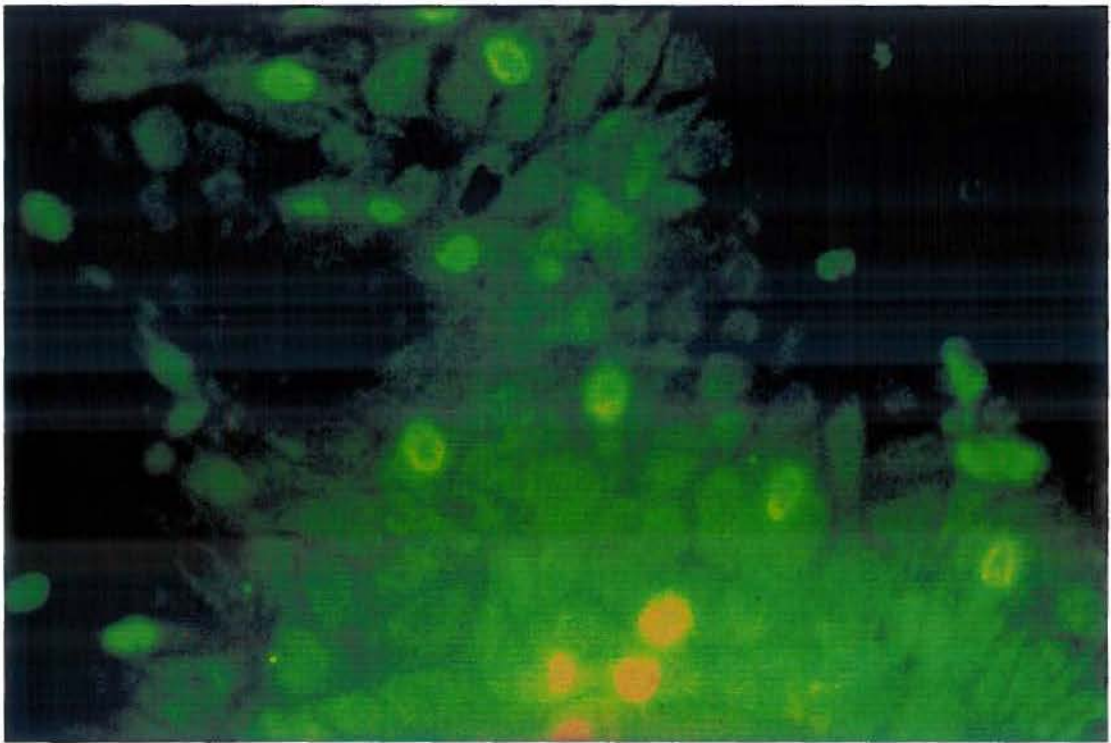
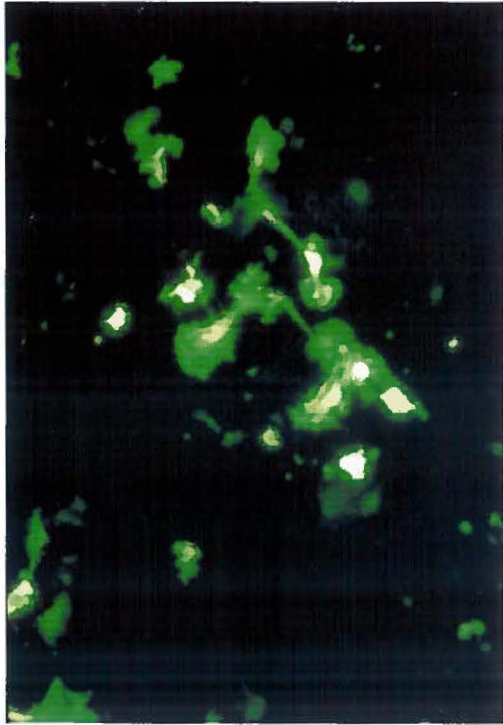
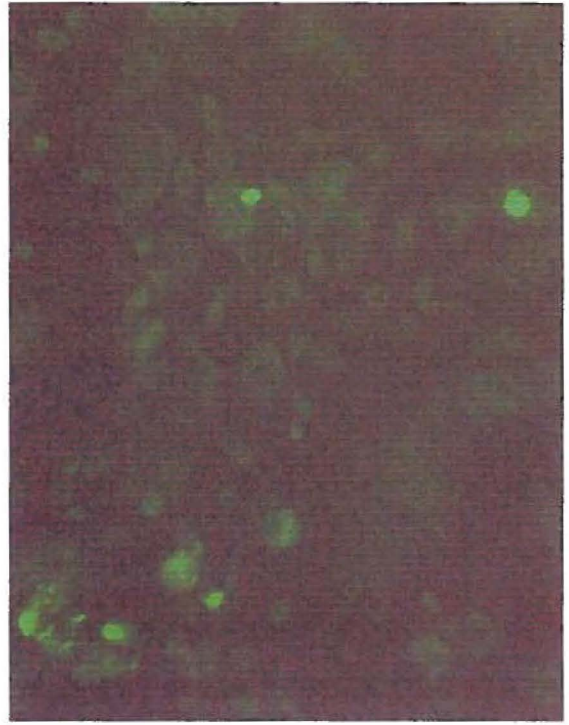


Figure 2 Distribution cellulaire en immunofluorescence de la souche Kresse et de la chimère N2xBK transfectées dans les cellules TV. Un contrôle de transfection GFP a été utilisé (A. 24 h.p.i., 20X) alors que les panneaux B et C montrent la transfection des cellules TV par un clone infectieux de la souche Kresse (B. 24 h.p.i., 10X; C. 24 h.p.i., 20X). La transfection de la chimère N2xBK permet d'observer quelques rares cellules dont le noyau est positif en immunofluorescence. (D. 24 h.p.i., 20X). Étant donné le faible niveau de fluorescence, l'intensité basale a été augmentée afin de distinguer les cellules.

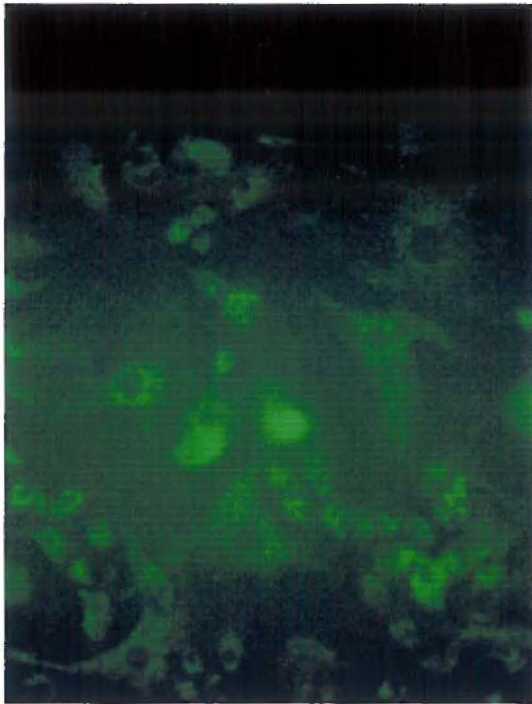
A



B



C



D

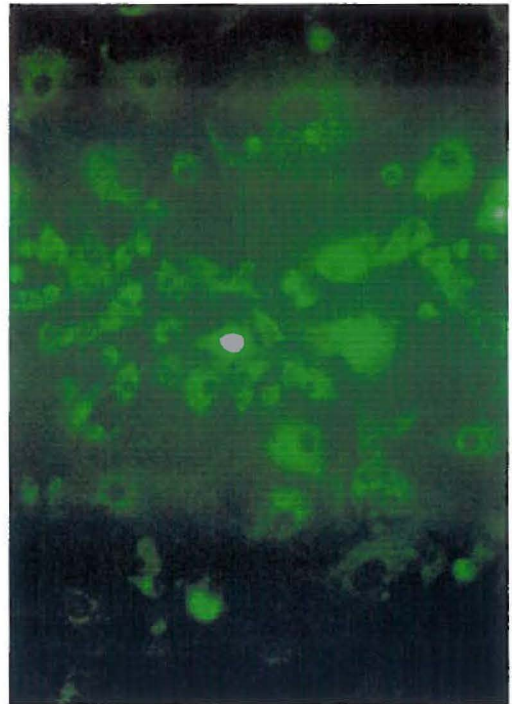


Figure 3 Distribution cellulaire de la chimère KxBN2 24 heures post-transfection dans les cellules TV. Le niveau de fluorescence observé dans ce cas est largement supérieur à celui observé chez des cellules transfectées avec les clones infectieux de la souche Kresse ou de la chimère N2xBK. (Grossissement 20X)

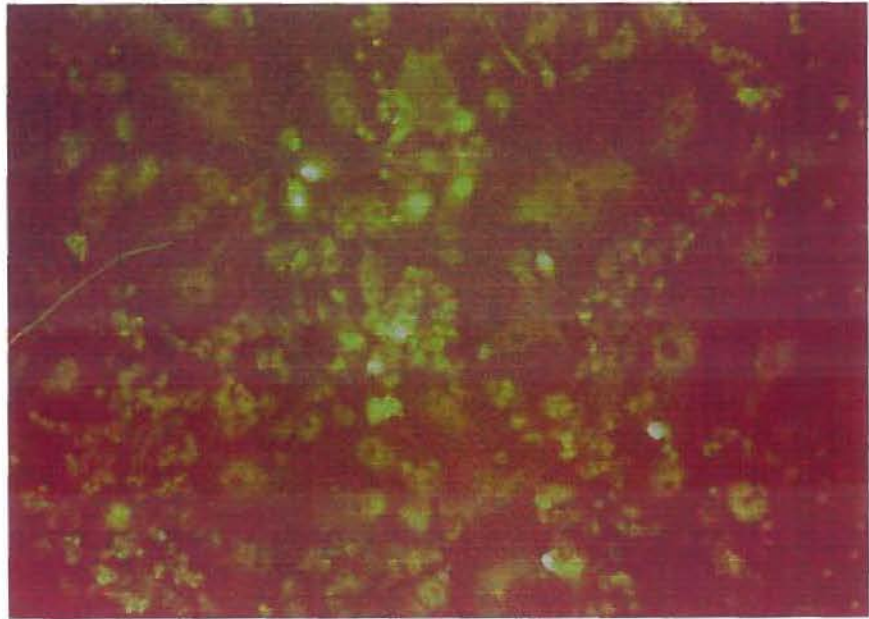
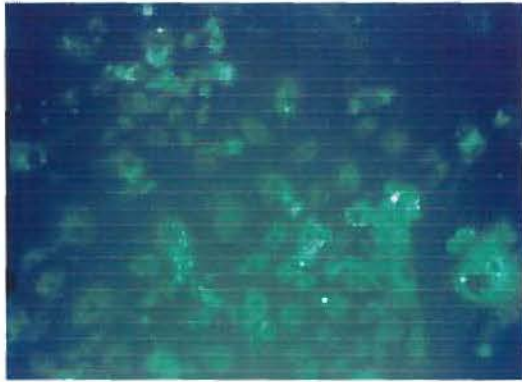
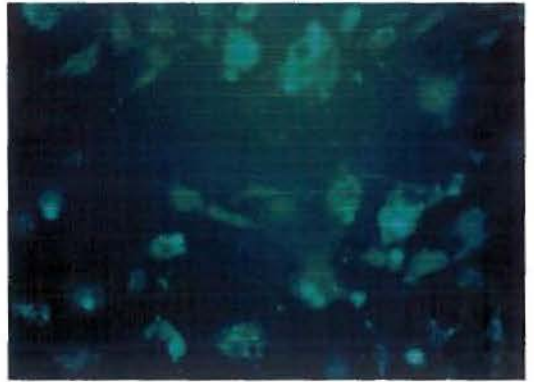


Figure 4 Infection des cellules TV par différentes souches ou chimères de PPV.
A. NADL-2 (48 h.p.i., 20X), B. Kresse (24 h.p.i., 20X), C. KxBN2 (48 h.p.i., 10X), D. KxBN2 (48 h.p.i., 20X), E. KxBN2 (60X)

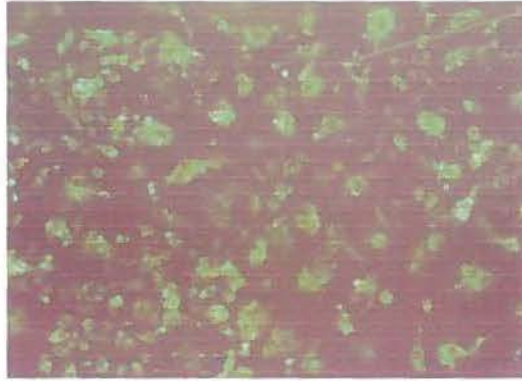
A



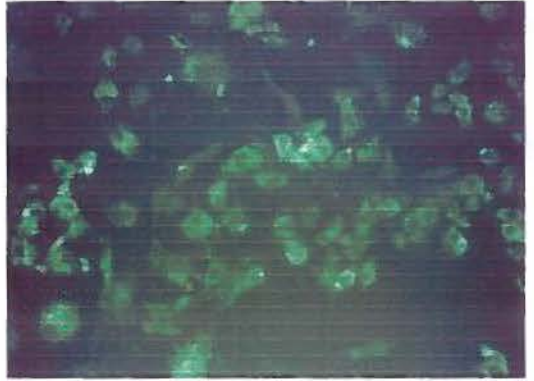
B



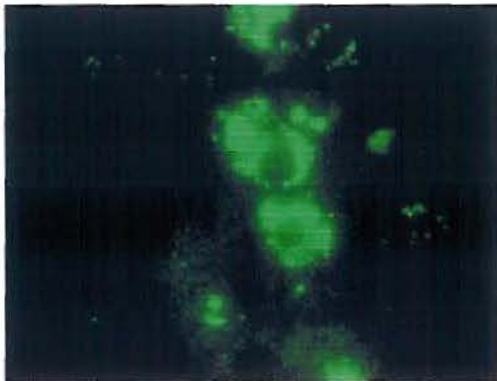
C



D



E



Chapitre 3

CHAPITRE 3 MÉTHODE DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION MASSIVE DU PARVOVIRUS PORCIN

Avant-Propos

Le troisième chapitre de cette section est consacré aux méthodes de purification du parvovirus porcine développées au cours de mes travaux de doctorat. Nos résultats ayant démontré l'importance de la capsid du parvovirus porcine dans le tropisme, probablement résultant d'un mécanisme similaire à celui retrouvé chez le parvovirus murin (MVMi vs MVMp) ou canin (CPV vs FPV), notre but était de comprendre l'impact structural des différences retrouvées entre les différentes souches.

Bien que la structure du parvovirus canin soit connue depuis 1991 (Tsao *et al*, 1991), ce n'est que tout récemment que les structures du parvovirus murin (Agbandje-McKenna *et al*, 1998) ainsi que celle du premier densovirus (Simpson *et al*, 1998) ont été publiées. Bien que les parvovirus porcine et canin possèdent une homologie relativement élevée au niveau de la capsid, la structure de CPV ne permet pas de déduire la position relative des résidus importants de PPV car les différences se retrouvent au niveau des boucles de surface de la capsid, dans les régions les plus divergentes.

Afin de déterminer la structure du parvovirus porcine, une grande quantité de virus (50-100mg) devait être purifiée pour élaborer les conditions de cristallisation.

Au fil des années, la qualité des cristaux de macromolécules biologiques (protéines, ADN, particules virales) est demeurée le facteur limitant dans la caractérisation de nouvelles structures par diffraction de rayons-X. Évidemment, la qualité des cristaux dépend des conditions de cristallisation et principalement, de la pureté et de l'homogénéité des préparations. Les méthodes courantes de purification de parvovirus ne permettant pas un niveau de pureté assez élevé, nous avons dû développer ou adapter d'autres méthodes. Celles-ci seront brièvement discutées ici.

INTRODUCTION

Les propriétés physico-chimiques des parvovirus permettent beaucoup de flexibilité quant au choix de la méthode de purification du virus. Les particules résistent à la chaleur et aux solvants organiques en plus d'être stables dans un éventail de pH relativement large.

Bien qu'une homologie élevée existe entre les parvovirus murins, canins et porcins, les protocoles utilisés pour leur purification varient considérablement. D'autre part, les conditions utilisées en culture cellulaire varient de façon importante, principalement à cause des cellules hôtes utilisées.

Les premiers essais effectués à l'aide de protocoles utilisés pour purifier soit MVM, soit CPV se sont avérés insatisfaisants pour le parvovirus porcine. Le principal problème rencontré était lié à la formation d'agrégats contenant, entre autre, une grande quantité d'ADN cellulaire. La présence de ces agrégats compliquait la purification du virus sur gradient de chlorure de césium (CsCl) à cause de la distribution du virus à plusieurs densités. De plus, une perte importante du virus survenait suite à la formation de complexes virus-membranes, probablement à cause de régions plus hydrophobes situées sur la capsid.

Les protocoles utilisés auparavant et les protocoles développés seront comparés et discutés dans ce chapitre sans toutefois séparer les méthodes des résultats afin de simplifier et d'alléger le texte.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

1. Méthodes de purification utilisées pour les parvovirus

1.1 Culture cellulaire

Les méthodes de production du virus par culture cellulaire ont été adaptées pour chaque virus. Alors que MVM est plutôt purifié à partir de cellules cultivées en feuillets (Tattersall et Bratton, 1983; P. Tattersall, communication personnelle), CPV ainsi que FPV sont cultivés en flacons de type “roller-bottle” avec un volume minimal de milieu de culture (Parker et Parrish, 1997). Le type de système choisi dépend évidemment des cellules utilisées. En collaboration avec le Dr. Colin Parrish (Cornell University), nous avons tenté de cultiver les cellules PT et PFT en “roller-bottles”, mais sans succès, les cellules ne pouvant être maintenues en culture de cette façon.

Les cellules PT et PFT ont donc été maintenues en feuillets en présence de milieu D-MEM avec 6% de sérum. Lorsque des feuillets étaient préparés pour une infection, la concentration de sérum était augmentée à 8% pour assurer une activité métabolique maximale.

1.2 Infections

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l’infection des cellules. Pour la production de stocks de virus, la façon la plus simple était de préparer une suspension cellulaire conduisant à une confluence de 40-50% et d’y ajouter l’inoculum à une MOI entre 0.1-1 dans un volume minimum. Du milieu frais était ajouté après environ 4 heures d’incubation. Une méthode équivalente de production consistait à infecter des cellules 80-90% confluentes à une MOI entre 1-10 dans un volume minimal pendant 1 heure à 37°C pour ensuite trypsiner les cellules et partager la totalité des cellules dans trois flacons. Ces deux méthodes permettaient d’obtenir une production de virus maximale vers 3 à 5 jours post-infection, telle que mesurée par hémagglutination.

Afin d'augmenter le nombre de cellules produites sans pour autant trop accroître le volume de milieu utilisé, les cellules ont été cultivées dans des "usines à cellules" (*Cell Factories*, NUNC) ayant une surface équivalente à environ 45 flacons de 150cm² mais ne requérant qu'environ 900mL de milieu de culture. Afin d'inoculer ces unités de production de cellules, 10 flacons de 150cm² à confluence de 90% étaient trypsinés. L'ajout des cellules ainsi recueillies dans 900mL de milieu permettait d'obtenir une confluence d'environ 40-50% pour l'infection. La production maximale de virus a été observée en ajoutant l'inoculum en même temps que les cellules.

1.3 Extraction des particules virales

La technique traditionnelle d'extraction des parvovirus faisait appel à trois cycles de congélation et décongélation du feuillet cellulaire afin de libérer les particules virales intracellulaires dans le cas d'un effet cytopathique modéré. En plus d'être néfaste pour la stabilité du virus, cette méthode entraînait la perte d'une très grande proportion de particules virales déjà présentes dans le surnageant si celui-ci n'était pas conservé (P. Tattersall et C. Parrish, communication personnelle).

Afin de maximiser la récolte du virus, deux méthodes ont été utilisées. La première méthode consistait à recueillir les cellules avant l'observation d'un effet cytopathique et à en jeter le milieu (MVM; P. Tattersall, communication personnelle). Les cellules pouvaient également être cultivées jusqu'à la présence d'un effet cytopathique maximum, le milieu étant ensuite clarifié (CPV; C. Parrish, communication personnelle).

Dans le cas où les cellules constituaient le matériel de départ, elles étaient lysées soit par sonication ou à l'aide d'un détergent comme le Igepal CA-630 (Sigma; similaire au NP-40 qui n'est maintenant plus disponible). Dans le cas du PPV, les deux méthodes sont également efficaces pour la lyse mais en plus d'être moins problématique pour le respect des normes de confinement biologique, l'utilisation du détergent augmente largement le rendement de purification de virus. Une concentration de l'ordre de 0,05% à 0,1% est normalement utilisée

pour lyser les cellules. Des concentrations finales allant jusqu'à 1% ont été testées sans affecter l'intégrité des particules virales (Figure 1).

Afin de minimiser la perte de virus dans le surnageant lors de la purification de PPV, nous avons adapté un protocole qui fait appel à la purification de virus intranucléaire présent tôt dans l'infection (Avalosse *et al*, 1996). Cette méthode sera discutée en détail plus loin.

2. Purification

2.1 Étapes préliminaires de concentration des particules

Les particules virales libérées des cellules, soit naturellement lors de l'infection ou encore par la lyse mécanique ou chimique des cellules doivent être concentrées puis purifiées. Deux méthodes de précipitation ont été utilisées, soient le chlorure de calcium (Molitor *et al*, 1983) ou le polyéthylène glycol (PEG) (Tattersall et Bratton, 1983; Weichert *et al*, 1998). Bien que le CaCl_2 ait été utilisé pour le PPV par d'autres groupes, nous avons plus de succès avec une précipitation au PEG 8000 (3,5%) en présence de 0,5M NaCl à 4°C. La perte de virus demeurant substantielle même avec le PEG, nous avons eu recours à des méthodes d'ultrafiltration avec des membranes de 100kDa (YM100, Amicon) ou encore des membranes de 500kDa (ZM500 pré-commercialisation, Amicon). En diafiltration dans un concentrateur de 500mL sous pression d'azote, plus de 50% des particules concentrées étaient alors endommagées sous l'effet de l'agitation. Bien qu'aucune explication n'ait pu être émise à l'époque, ce problème pouvait être lié à la taille des agrégats car des particules purifiées mais diluées peuvent être concentrées de cette façon. La centrifugation au culot des particules virales par ultracentrifugation constitue une alternative aux méthodes de précipitation dans le cas où des petits volumes sont utilisés mais devient trop laborieuse dans le cas d'échantillons plus volumineux.

La concentration des particules virales contenues dans le surnageant par ultrafiltration sur une membrane de 10^6 Da a également été utilisée dans les mêmes conditions que celles utilisées pour CPV. Alors que cette méthode est très efficace pour CPV, aucune particule virale n'a

pu être purifiée ainsi, probablement à cause de leur désintégration (C. Parrish, communication personnelle).

2.2 Purification finale des particules

L'ultracentrifugation est demeurée la meilleure méthode pour la purification finale des particules. Lorsque le volume d'échantillon était réduit considérablement, il était premièrement appliqué sur un gradient de sucrose (180 000 x g, 4h, 12°C) d'une concentration initiale de 20% sucrose qui, une fois formé par congélation (-20°C, 6h) et décongélation (20°C, ~2h) résultait en un gradient de 10-40% environ. La bande de virus était ensuite purifiée sur gradient de chlorure de césium (200 000 x g, 24h, 12°C) permettant ainsi de séparer les particules vides d'une densité de ~1,30 g/mL et les particules pleines d'une densité de ~1,40 g/mL. Les particules ainsi purifiées étaient dialysées contre un tampon Tris/NaCl à pH 8,0 contenant 1mM CaCl₂ et 1mM MgCl₂. Au lieu de la dialyse, l'ultrafiltration (diafiltration) est normalement utilisée sur des unités Centricon (100 kDa, Amicon) afin de minimiser les pertes.

3. Méthode de purification optimisée

3.1 Purification de virus dans la fraction nucléaire

Afin de pallier au divers problèmes rencontrés dans les étapes de purification du PPV, nous avons adapté un protocole qui fait appel à la purification des particules virales dans le noyau des cellules infectées (Avalosse *et al*, 1996). Ce protocole consiste à la lyse successive des cellules puis des noyaux où sont concentrés les virus. Après un traitement à la DNase et RNase (10 µg/mL final chacun, 37°C pendant 1h), la suspension est clarifiée puis concentrée sur un filtre de 100kDa (Centricon, Amicon). La dernière étape consiste en une purification sur un gradient combiné de sucrose et de CsCl tel que décrit précédemment.

Ce protocole ayant été conçu dans le but de purifier des petites quantités de particules virales recombinantes, il a dû être optimisé afin de permettre la purification de virus à partir d'une plus grande quantité de cellules. De plus, le protocole original entraînait la perte de 50% des particules virales initialement dans l'échantillon (Avalosse *et al*, 1996).

3.2 Optimisation et mise à l'échelle

Nous avons apporté certaines modifications à ce protocole afin de permettre la purification sur plus grande échelle et de pallier à certains problèmes spécifiques au PPV. Dans un premier temps, nous avons observé qu'afin d'optimiser les rendements, il serait plus profitable de purifier les virus contenus dans la cellule entière. Cette modification cause un problème d'agrégation substantiel qui peut être résolu par une extraction au tétrachlorure de carbone ou au chloroforme. D'après nos observations, le virus a tendance à adhérer aux membranes de la cellule. En effet, la lyse des cellules avec 0,2% NP-40 et la clarification subséquente par centrifugation entraîne près de la moitié des particules virales au culot alors qu'avec des concentrations plus élevées de détergent (e.g. 1,0% NP-40), moins de particules se retrouvent au culot avec les débris de membranes.

La deuxième optimisation au protocole consistait à traiter la suspension cellulaire avec de la trypsine (0,25% en présence d'EDTA) pendant une heure (37°C) après le traitement à la DNase et RNase. Cette étape permettait de réduire considérablement la concentration de protéines contaminantes alors que le virus est résistant à ce traitement.

3.3 Protocole de purification pour le parvovirus porcin

Un stock de cellules PT destinées à être infectées était produit dans des flacons de 150cm² jusqu'à 85-90% de confluence afin d'éviter que les cellules forment des agrégats. L'ensemencement des "usines à cellules" de 10 étages requière les cellules provenant de dix flacons de 150cm². Une fois les feuillets cellulaires rincés avec du PBS stérile, les cellules sont incubées en présence de 8 mL de trypsine-EDTA (Gibco BRL) pendant 10 minutes à 37°C.

Les cellules trypsinées sont centrifugées à 300 x g pendant 5 minutes (culot lâche) puis ensuite resuspendues dans 900mL de milieu D-MEM (8% sérum) en présence de l'inoculum viral à une MOI de 5-10 dans le cas des "usines à cellules". La MOI utilisée était plus élevée que pour des feuillets cultivés en flacons de 150cm² car le volume de ces unités est déjà minimal mais tout de même relativement plus grand que pour des flacons réguliers. De plus, les manipulations doivent être minimisées afin d'éviter les risques de contamination avec ce type

d'unités. Les cellules sont recueillies 24-26h post-infection par trypsination après rinçage au PBS. La solution de trypsine/EDTA (environ 500mL) est laissée environ 10 minutes puis les cellules sont retirées. Le flacon est ensuite rincé avec 200mL de PBS qui est ajouté à la suspension de cellules. Les cellules sont envoyées au culot par centrifugation et le culot de cellules est resuspendu dans 10 volumes de tampon contenant: 0,5M hexylène glycol (Sigma), 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM Tris-Cl pH 6,8. Une fois les cellules resuspendues, un volume de tampon identique au précédent mais contenant 0,1% Igepal CA-630 est ajouté (concentration finale de détergent à 0,05% pour 20 volumes de culot cellulaire).

La suspension de cellules est ensuite pipetée à répétition (pipette pasteur) afin de briser les membranes plasmiques. Après une incubation de 10 minutes d'incubation, la suspension est centrifugée à 1000 x g pendant 5 minutes afin de récupérer les noyaux. Le surnageant est extrait à deux reprises avec 2 volumes de tétrachlorure de carbone en agitant fortement sans vortexer. La fraction aqueuse extraite est conservée sur glace (un échantillon peut être gardé pour la microscopie électronique) pendant que les noyaux sont rincés avec 20 volumes du même tampon sans détergent puis centrifugés dans les mêmes conditions. Les noyaux sont ensuite lysés avec un tampon 50mM Tris-Cl pH 8,5, 1mM EDTA contenant 0,3% Igepal CA-630 suivi d'un traitement avec RNase et DNase I (20µg/mL) à 37°C pour 30 minutes à laquelle nous avons ajouté la phase aqueuse obtenue précédemment par extraction. La suspension est ensuite traitée avec 1 volume de solution de trypsine / EDTA (Gibco BRL) pour 30 minutes supplémentaires à 37°C puis clarifiée par centrifugation à 12000 x g pendant 10 minutes.

Le surnageant brut est ensuite concentré sur unité d'ultrafiltration Ultrafree-15 (100 kDa; Millipore) avant d'être déposé sur un gradient de sucrose. Un échantillon concentré est conservé pour la microscopie électronique (Fig. 2). Le gradient de sucrose (dans du tampon Tris et EDTA comme ci-haut) est formé à partir d'une solution de sucrose à 20% congelée puis décongelée. Les gradients sont centrifugés à 100 000 x g pendant 120 minutes et les bandes de virus sont prélevées. Celles-ci sont ensuite ajoutées à une solution de 1,39 g/mL CsCl dans le même tampon qui est alors centrifugée pendant 24 heures à 100 000 x g. Les

bandes de virus sont prélevées et diafiltrées sur concentrateurs à porosité de 100kDa (Microcon, Centricon ou Ultrafree-15 selon le volume; Amicon/Millipore) à l'aide d'un tampon 50 mM Tris pH 8,3, 150mM NaCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂. Le virus ainsi obtenu peut être utilisé directement pour la cristallisation (Fig. 3).

RÉSULTATS ET CONCLUSIONS

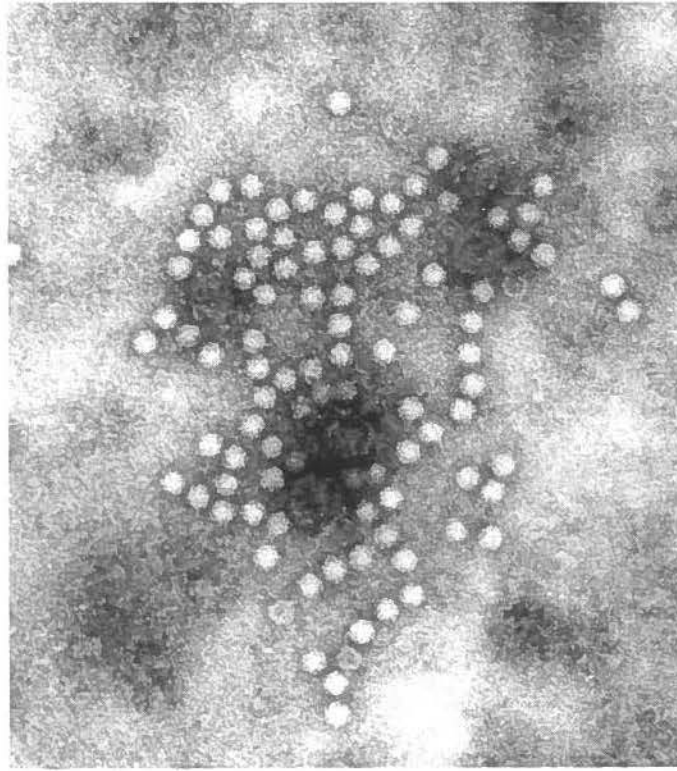
Suite à plusieurs essais infructueux de purification du parvovirus porcin, nous avons développé un protocole de purification de virus à partir de noyaux de cellules infectées, adapté à nos besoins. Nos résultats ont réaffirmé l'importance de la multiplicité d'infection et des conditions d'inoculation telles que la densité cellulaire.

Le protocole final a été développé en vue de résoudre un problème principal qui est la perte importante (>50%) de virus à cause de sa tendance à adhérer aux membranes et à former des agrégats. Les pertes ont été minimisées par la récolte des cellules tôt dans l'infection et par la stabilisation des noyaux. En revanche, l'extraction du cytosol permet de récupérer près de la moitié des particules s'y trouvant (10-20% du total). En résumé, la perte nette est encore relativement élevée, soit environ 20% en tenant compte des titres viraux au début et à la fin, pour une quantité approximative de 0,8 à 1,5 mg par préparation, ce qui est néanmoins variable. Afin d'augmenter la capacité de production, des protocoles permettant de purifier le virus dans le surnageant (48-60h p.i) devront être adaptés.

Le degré de pureté du virus à l'étape finale est normalement assez grande pour permettre de préparer des plateaux de cristallisation. Dans l'éventualité où le virus ne serait pas assez purifié, il est possible de séparer des contaminants protéiques par chromatographie (tamis moléculaire) à condition que les protéines n'interagissent pas avec le virus. En effet, un tel protocole a déjà été développé pour la purification de capsides recombinantes et de particules virales par FPLC à l'aide d'une résine Sephacryl S-1000 SF (Pharmacia).¹

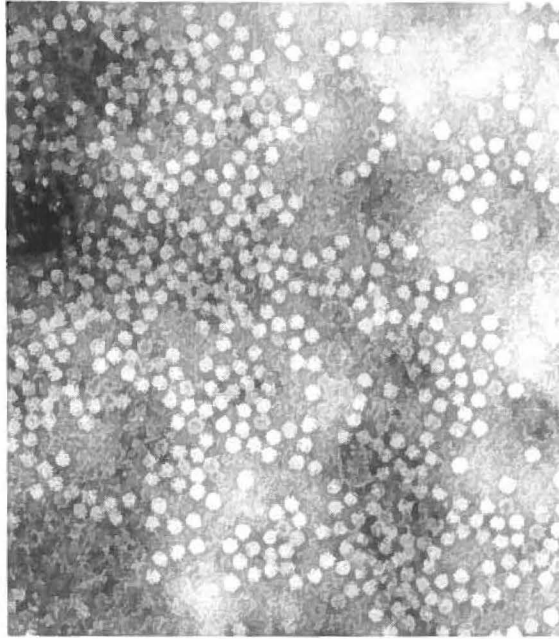
¹ Hébert, B., A. Simpson, Z. Zádori, M. Rossmann et P. Tijssen, non publié

Figure 1 **Résistance de PPV à un traitement de 1% Igepal CA-630.**
(Coloration au PTA 2%, 150 000 X)

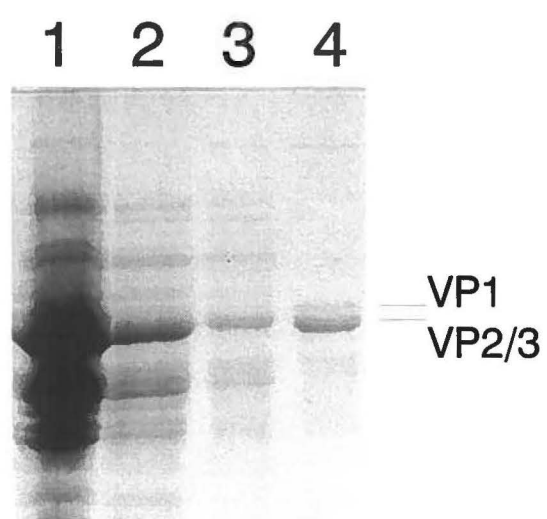


- Figure 2** **Purification intermédiaire de PPV.**
- A. Micrographie en coloration négative (PTA 2%, 120 000X)**
 - B. Visualisation du cheminement de la purification par SDS-PAGE.**
 - 1. Fraction brute cellulaire**
 - 2. Fraction nucléaire**
 - 3. Échantillon pré-concentration**
 - 4. Échantillon post-concentration**
-

A

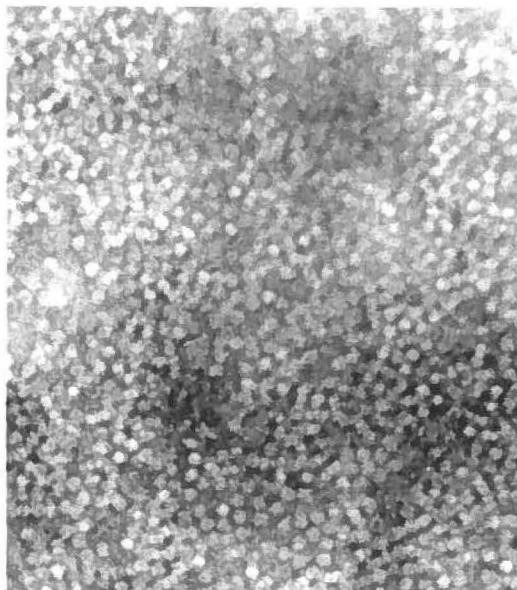


B

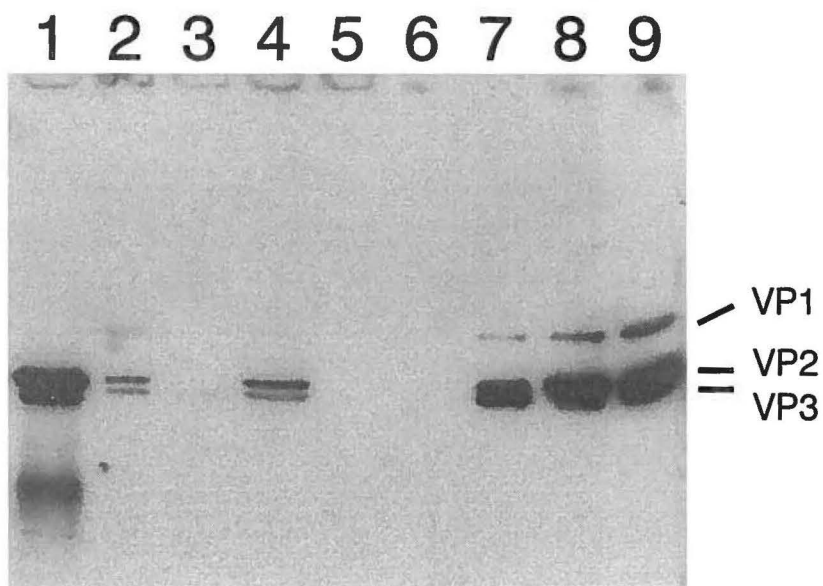


- Figure 3** **PPV purifié par gradient de CsCl**
- A.** Micrographie en coloration négative (PTA 2%, 120 000X)
- B.** Cheminement de la purification et perte de virus dans les différentes étapes de la purification par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11.
1. Échantillon cellulaire brut;
 2. Surnageant concentré de la préparation des cellules (perte ~5%);
 3. Surnageant concentré du lavage des noyaux (seuil de détection);
 4. Fraction nucléaire traitée à la trypsine
 - 5-8. Fractions provenant du gradient de CsCl
 9. Virus purifié traité à la trypsine

A



B



CHAPITRE 4

CHAPITRE 4 NOUVELLE MÉTHODE DE MUTAGÉNÈSE DIRIGÉE

avant-propos

Nous avons développé une nouvelle méthode de mutagenèse dirigée suite à plusieurs difficultés techniques éprouvées lors du travail sur les clones infectieux. Cette alternative était nécessaire car les régions d'intérêts ne pouvaient être sous-clonées facilement.

La méthode originale repose sur l'utilisation du PCR où des amplicons sont générés en présence d'une quantité limite de gabarit et d'oligonucléotides mutagéniques. Après un nombre restreint de cycles d'amplification, l'ADN parental (gabarit) est digéré à l'aide de l'enzyme de restriction *Dpn* I qui reconnaît une séquence spécifique méthylée ou hémiméthylée (5' G^mATC 3'). Le milieu réactionnel est ensuite utilisé pour transformer des bactéries dont les colonies pourront être criblées afin d'identifier des clones portant la mutation d'intérêt.

Notre modification du protocole original utilise la protéine du gène 32 du phage T4 pour augmenter considérablement l'efficacité de mutagenèse, même dans les cas les plus simples. Nous présentons également deux alternatives aux oligonucléotides dans la réaction de mutagenèse.

**GENE 32 PROTEIN ENHANCES EFFICIENCY OF PCR/*Dpn* I-BASED
MODIFIED SITE-DIRECTED MUTAGENESIS METHODS**

by

Benoît Hébert and Peter Tijssen

INRS – Institut Armand-Frappier
Biotechnology Research Center
Laval, QC Canada H7V 1B7

Address correspondence to:

Peter Tijssen
INRS – Institut Armand-Frappier
Biotechnology Research Center
Laval, QC Canada H7V 1B7

phone: 450-687-5010, ext. 4425 (office) or 4636 (lab)

fax: 450-686-5626

email: peter_tijssen@iaf.quebec.ca

Keywords: site-directed mutagenesis, polymerase chain reaction, T4 gene 32 protein
DNA methylation

BENCHMARKS

Functional studies usually require modifying wild-type proteins in order to disrupt their native function. Site-directed mutagenesis has thus become a common procedure in the laboratory, of which countless variations exist. One of the popular mutagenesis method currently used involves a combination of PCR and specific digestion of the methylated and unmethylated parental DNA species (Sugimoto *et al*, 1989)(Vandeyar *et al*, 1988). Its popularity stems from the lack of subcloning requirements, ease of use and overall efficiency. Briefly, this method requires a *dam* methylated template DNA plasmid purified from most commonly used *E. coli* strains, a pair of mutagenic primers and the restriction enzyme *Dpn* I which cleaves hemimethylated or methylated DNA (5' G^{m6}ATC 3') and *Pfu* polymerase or other suitable high fidelity thermostable polymerase. The mutagenesis reaction is performed in a manner analogous to a regular PCR starting with a small amount of template DNA (10-20 ng) and low number of cycles (~15). The resulting mixture of mutated amplicons and parental DNA is treated with *Dpn* I to digest the later followed by transformation of the mixture in *E. coli* and screening for mutants (Li et Wilkinson, 1997).

Besides problems related to efficiency of mutagenesis due to presence of too much parental DNA or poorly designed primers and cycling parameters, large plasmids or secondary structures in the template DNA can prevent the mutagenesis to occur. Often, subcloning the fragment of interest for mutagenesis in absence of these secondary structures or by using a smaller construct would be ideal but not possible for either practical reasons or absence of suitable restriction sites for subcloning. Combination of problems (large hairpin structures and lack of sites) in mutagenesis of porcine parvovirus infectious clones (Bergeron *et al*, 1996) led us to modify and optimize the commonly used protocols for PCR/*Dpn* I mediated mutagenesis.

In this report, we demonstrate the increase in efficiency of mutagenesis obtained in presence of T4 gene 32 protein. Previously, T4 gene 32 protein has been shown to increase amplification yields in long-PCR (Schwarz *et al*, 1990). We also present alternatives to the

use of multiple oligonucleotides for mutagenesis of a gene in order to reproduce an alternate allele or mutant containing either multiple differences or insertions and deletions. These methods are especially useful when exchange of restriction fragments is impossible because of the limited choice of enzymes available. Enhancements to the routinely used mutagenesis method are described and alternatives are discussed thereafter.

Protocols using mutagenic primers required them to be between 30 and 45 bases in length for maximum efficiency. The mutations to be introduced should be located near the middle of the primers and should, whenever possible, either knock-out or add a unique restriction site in its design so that screening can be accomplished more easily.

The PCR reaction was performed in a final volume of 50 μ L composed of 2.5U *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) with its own reaction buffer (final concentrations of 10 mM KCl, 6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM MgCl_2 , .1% Triton X-100 and 10 μ g/mL BSA), 1 pmol of each primer, 1 nmol T4 gene 32 protein (Pharmacia), 0.25 mM dNTP (each, final concentration) and 25-100 ng template DNA (dsDNA plasmid). From our experience, overall efficiency is greater with a slight increase in the quantity of template DNA while background remains the same provided *Dpn* I digestion is long enough.

The cycling was performed in a Perkin-Elmer 9700 thermal cycler in the following conditions: one cycle of 30 sec at 94°C; 16 cycles of 30 sec at 94°C, 60 sec at 55°C and 12 min at 72°C (approx. 1.5-2 min / kb of plasmid) followed by a 20 minute extension at 72°C. After cycling is completed, 10 U of *Dpn* I restriction enzyme is added to the reaction and incubated for 1.5h at 37°C. Bacterial transformation is done in *E. coli* XL2-Blue (Stratagene) with 1 μ L of the reaction and plating half the mixture on LB plates. The positive mutagenesis control was plasmid pWhitescript and its control primers (Stratagene).

When the comparison was done for mutagenesis reactions in presence or absence of T4 gene 32 protein, the results obtained showed it has a beneficial effect on the overall efficiency of mutagenesis (Table 1). In all cases, the use of T4 gene 32 protein increases the

efficiency of mutagenesis for difficult plasmids and even increased the number of mutants in the control reaction.

We also assayed for the ability of T4 gene 32 protein to increase efficiency of a modified method where PCR amplicons (200-300 bp) and purified unmethylated DNA fragments were used. Amplification of a porcine parvovirus VP2 region in which 3 point mutations are found was done with primers originally used for sequencing by primer-walking. The amplicons were gel-purified, extracted and quantified prior to be used as primers. Alternatively, we used DNA purified from *E. coli* strain SCS110 which is deficient in *dam* / *dcm* methylation. Gel purified restriction fragments ranging from 300 to 800 bp have been tested with this modified protocol. In both cases, similar results were obtained and the efficiency was over 80% while in the absence of T4 gene 32 protein, no mutant clones could be rescued.

To summarize, we found that use of T4 gene 32 protein systematically increased the efficiency of mutagenesis, especially in clones containing important secondary structures which normally prevent *Taq* DNA polymerase elongation through such regions. In addition, we have demonstrated the use of alternatives to primers in PCR reactions. We have successfully replaced traditional oligos by purified amplicons or purified unmethylated restriction fragments. The improvements and alternatives presented should be of use in many cases where structure-function studies warrant the construction of chimeric clones.

Acknowledgments

This work was supported in part by a Collaborative grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada to Peter Tijssen and a fellowship from the Fondation Armand-Frappier to Benoît Hébert.

Table 1**PCR / *Dpn* I mutagenesis efficiency in presence of T4 gene 32 protein**

	T4 gene 32 protein	
	-	+
pWhitescript control	80	110
Oligos (37-mer)	0	34
Oligos (42-mer)	0	52
Purified amplicon #1	4	60
Purified amplicon #2	0	38
Purified amplicon #3	0	3
Unmethylated DNA fragment #1	0	41
Unmethylated DNA fragment #2	2	27

SECTION III

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

AVANT-PROPOS

La première partie, rédigée et publiée en 1995, fait le point sur le parvovirus porcine et sur nos travaux soumis pour publication au même moment. Cette section comprend donc des informations concernant le pouvoir pathogène, la réponse immunitaire, la caractérisation moléculaire du virus et de ses protéines, les vaccins et une section plus importante sur le tropisme.

Par la suite, nos travaux seront discutés en fonction de résultats obtenus par d'autres laboratoires au cours des dernières années. Une attention plus particulière sera portée sur les aspects structure-fonction.

Finalement, les perspectives et travaux en cours seront discutés en plus de souligner l'importance du parvovirus porcine en tant que pathogène pour l'Homme dans le cas des xéno greffes.

Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties

(Running title: Porcine parvovirus)

Peter Tijssen, Jean Bergeron, Roger Dubuc and Benoît Hébert

Key words: porcine parvovirus / allotropic determinant / splicing strategy/ vaccines / parvovirus diagnostic

From the Centre de recherche en virologie, Institut Armand-Frappier,
Université du Québec, Case postale 100, 531, boul. des Prairies,
Laval, Québec, Canada, H7N 4Z3

SEMINARS IN VIROLOGY, 6(5): 319-328. 1995.

Abstract

Porcine parvoviruses display only very few genomic differences. Nevertheless, they can be segregated into four distinct groups with respect to their cellular tropism and pathogenicity. Chimeric constructs produced by exchanging restriction fragments between infectious clones of nonpathogenic and pathogenic strains permitted the identification of the allotropic determinant. This determinant contains only three amino acid changes which have been predicted to be located on external loops of the capsid protein. One of these differences, S436P, is probably located on top of the three-fold spike. Several lines of evidence indicate that tropism is determined by an intracellular interaction with host cell proteins and not by a distinguishing receptor. The expression strategy of these parvoviruses, which differs from the well-characterized MVM/H-1 group, and the importance for differential diagnosis and prevention are also discussed.

Key words:

Porcine parvoviruses/allotropic determinant/splicing strategy/vaccines/parvovirus diagnosis

INTRODUCTION

Porcine parvovirus (PPV) is the major causative agent in a syndrome of reproductive failure in swine, which includes stillbirths, mummified fetuses, early embryonic death, and infertility.^{1,2} PPVs have been isolated from a worldwide variety of sources including swine tissues, mummified fetuses, skin lesions and as contaminants of cell cultures.³ PPV-like viruses have also been recovered from diarrheic feces of pigs.⁴⁻⁶ Except for some Japanese enteric (putative PPV) isolates, antigenic differences were not detected among PPVs with homologous and heterologous polyclonal antisera.

PPV is an autonomously replicating parvovirus, classified in the Parvovirus genus, with physicochemical properties and genomic sequences which resemble those of MVM and H-1 rodent parvoviruses, mink enteritis virus (MEV), canine parvovirus (CPV) and feline panleukopenia virus (FPV).^{7,8} Molecular characterization of some PPV strains revealed an almost perfect sequence identity among the genomes of virulent and avirulent strains.⁹ Despite this close genomic relationship among PPVs, strains can be distinguished into at least four groups with respect to pathogenicities: nonpathogenic (KBSH, NADL-2), pathogenic to non-immunocompetent fetuses leading to death (e.g. NADL-8, IAF-76), pathogenic to immunocompetent fetuses *plus* causing dermatitis (highly pathogenic, e.g. Kresse, IAF-A54), and enteric strains (Table 1).

PPV PATHOGENICITY AND IMMUNE RESPONSE

The increased virulence of the Kresse dermatitis strain towards fetuses with respect to common pathogenic strains, such as NADL-8, suggested a higher level of replication.^{10,11} The ability of the host's immune response to clear the virus might thus be overwhelmed.

In addition, the presence of immune complex deposits in tissues from Kresse virus-

inoculated fetuses might indicate that lesions observed are the result of an immune-mediated disease.¹² This type of pathology is well described in infection of mink with Aleutian disease parvovirus (ADV) and clearly suspected in humans infected with B19 parvovirus where, after the virus replication phase, a rash illness occurs at a time of a detectable immune response.¹³ Although dermatitis lesions on young swine could be more indicative of an immunological response (immune complexes) rather than a specific tropism of Kresse strain for skin cells, this biological difference with other pathogenic strains must reside in the genetic constitution of the virus. In contrast to these well-documented strain differences, Lager *et al.* reported a higher virulence of NADL-8 compared to the Kresse strain following experimental infection of late-term gestation fetuses.¹⁴ They explained this discrepancy by the different routes used to administer virus to fetuses. Using intra-amniotic instead of subcutaneous injections,¹¹ the authors related the Kresse strain to its isolation from dermatitis lesions and suggested it could be more pathogenic by subcutaneous exposure. Although the route of infection may play a role, tropism for skin cells does not explain results of Oraveerakul *et al.*¹² who used intramuscular injection of Kresse in fetuses.

To date, no studies have been reported regarding the cell-mediated immune response to PPV. Since it is becoming evident that the type of response (T_H1 versus T_H2) dramatically influences the pathogenesis of different viruses and the eventual outcome of the disease, it can be postulated that infection of different strains of PPV would modulate a differential response in pigs.^{15,16} For instance, infection with the Kresse strain might induce a switch from T_H1 to T_H2 , thus reducing cellular immune response and increasing B-cell activities like hypergammaglobulinemia. The strain of virus as well as the dose or the route used for infection could thus explain variations in pathogenicity.

MOLECULAR BIOLOGY OF PPV

PPV encapsidates virtually only the "-" strand of DNA like many other autonomous parvoviruses. Only very few differences can be observed in the restriction maps of the best

studied PPV strains, KBSH, NADL-8, NADL-2 and Kresse. One extra *MspI* site and one extra *NsiI* site were found for KBSH and NADL-2,¹⁷ respectively. Sequencing of NADL-2,¹⁸⁻²⁰ 90HS²¹ and Kresse⁹ confirmed that the genomic determinants responsible for the differences in pathology of these strains are very subtle.

The genome organization (Figure 1) of PPV resembles that of MVM and H-1, but particularly, due to the location of the splicing sites, those of CPV, MEV and FPV. This figure shows that the genome is organized in two large and two small ORFs. The small and left large ORFs code for, putatively three, nonstructural proteins (NS) while the right small and large ORFs are coding for the two structural proteins (VP). A third VP is generated by trimming a 4 kDa N-terminal fragment from VP-2 by a cellular protease.

Role of noncoding sequences

Functionality of the virus requires an economical use of the compact 5-kb genome in order to mediate their preferential replication in cells. Regulatory sequences and other noncoding sequences involved in virus replication, transcription or encapsidation are found at both ends of the genome but also overlap coding sequences. Both extremities of the PPV genome can form hairpin structures. At the 3'-end (left-hand side) of the single-stranded genome, the sequence allows for a folding into a Y-shaped palindrome (117 nts) and can thus serve as a primer during the early stages of replication (generation of double-stranded DNA before transcription). This left-hand palindrome shares with other parvoviruses the property of imperfect pairing ("bubble") which has been shown recently to be important for the selective binding of the transcription factor USF to the internal arm of the Y-hairpin only (TATA-box 115 nts downstream) whereas the upmodulating NF-Y factor binds to both arms just outside the bubble.²² This bubble is also involved in the segregation of the origin of replication.²³ At the other end, the 5'-hairpin (200 nts) plays a crucial role in the viral replication, i.e. in a rolling hairpin mechanism which results in two alternative sequences of 44 nts ("flip" and its reverse complement "flop") within the hairpin. Since both extremities of the NADL-2 and

Kresse strains share identical sequences, they do not seem to be responsible for the differences in pathogenicity.

A repetition of 127-bp is located in the right-hand noncoding region of NADL-2 and starts just before the stop codon of the right ORF. In contrast, the Kresse strain, like all pathogenic strains studied thus far, lacks this 127-bp repeat. The exact role of this tandem repeat is not clear. Each of the repeats contains four AATAAA motifs, none of which is functional (functional AATAAA is 20 nts downstream of repeat). These repeats are very AT-rich which may have a negative effect on the stability of the transcripts.²⁴ Similar to the situation with PPV, the more viremic MVMi lacks the 65-bp repeat present in MVMp.²⁵ However, *in vitro* studies showed that removing the 65-bp repeat in MVMp inhibited replication 10 to 100-fold (depending on host cell).²⁶

Viral transcription is under the control of two promoters. TATA₁₉₆ directs the synthesis of mRNAs for the NS proteins and TATA₂₀₀₄ those for VP proteins. Although it has been reported for PPV that some expression was obtained from the P40 promoter but not from the P4 promoter in nonpermissive cells,²⁷ it is generally accepted thus far that P40 is transactivated by NS1 generated from P4 (see later). Two control elements were observed upstream of TATA₂₀₀₄: (i) an enabling sequence at position 1949 (8/8 nucleotides homologous to the one found at the same location in the CPV genome); and, (ii), a tar (transactivation response) element 120 nts upstream of TATA₂₀₀₄ (virtually 100% conserved with the one found in the P40 promoter of H-1 parvovirus).²⁸ No differences were observed at this level between the pathogenic and nonpathogenic strains.

Transcripts, splicing strategy and protein products

The splicing strategy differentiates PPV and the CPV, MEV, FPV group from the MVM, H-1 group and is discussed in detail in this issue by Pintel. For PPV NADL-2, three major bands were observed after Northern hybridization, corresponding to 4.7, 3.3 and 2.9 kb.^{20,27} Two

different 5'-ends, at nt 225 and at 2035, were identified for these transcripts (Figure 1).²⁰ All processed transcripts co-terminate at nt 4833 in the case of NADL-2 and 4706 for Kresse (Figure 1). Like other parvoviruses of the same group, an unspliced transcript of 4.7 kb (R1) is coding for the NS-1 protein. This transcript may have escaped splicing since it contains an unusual donor site (547-CG/GC).

Crucial is the role of two small, alternative and overlapping introns (A and B in Figure 1) and their location with respect to the stop codons of the NS proteins. Two donor sites (2280-AG/GT and 2313-AG/GT) were found to be alternatively spliced to the same acceptor site (2386-AG/G).²⁰ The first donor site is located downstream of the NS-1 stop codon (2278-TAA) and 33 nucleotides downstream of the NS-2 stop codon (2247-TGA) in contrast to MVM which uses two acceptor sites and of which the NS-2 stop codon is between the donor sites. Consequently, with A-splicing (Figure 1) MVM NS-2 obtains a different C-terminal sequence than with B-splicing. PPV NS-2 does not have this heterogeneity, but this seems compensated by the R3 processing by which an NS-3 could be obtained (splicing of common N-terminal ORF to small right ORF). By sequence homology, the location of CPV splicing sites and stop codons is similar to PPV. However, the unique sequence in CPV NS-3 would be only a few amino acids. Although there seems no question whether NS-3 would be synthesized (all NS proteins have the same 86 N-terminal amino acids), a function of such a protein remains to be confirmed. The predicted molecular mass of the NS proteins is 75.5 kDa for NS-1 (84 kDa has been reported for the phosphorylated form²⁹), 18 kDa for NS-2 and 12.5 kDa for NS-3.

The small introns determine also which VP is synthesized from the R4 transcripts. The initiation codon 2287-ATG of VP1 is removed by A-splicing, thus forcing the use of the next initiation codon at position 2810-ATG for the synthesis of the VP2 (expected to be 64.3 kDa). The initiation codon at nt 2287 is preserved with the alternative B-splicing resulting in a protein of 80.9 kDa (VP-1).

Kresse mRNA processing shows a splicing strategy identical to that of NADL-2.³⁰ Moreover, all strains and isolates sequenced to date show 100% identity for the donor and acceptor sites and their vicinity and seem to exclude an impact on this level on the pathogenic ability of the PPV strain.

Functions of nonstructural proteins

Little is known about the functions of the PPV NS proteins. NS-1 has a high homology with similar proteins from other parvoviruses (about 85%) in contrast to the VP proteins (70% and less). Many functions of these pleiotropic NS proteins are, therefore, expected to be similar. Sequence motifs of a superfamily III helicase and initiator protein that may be involved in the rolling hairpin replication mechanism have been identified (see Tijssen and Bergoin, this issue). In addition to the important roles in viral replication (both sets of motifs are in the unique sequence of NS-1), NS-1 is also an important regulator/trans-activator of viral gene expression by interacting with the Sp1 transcription factor.³¹ Domain swapping experiments and deletion mutant analysis showed that this potent activational domain is located within the C-terminal amino acids of NS-1.³¹⁻³² NS-1 contributes to the resolution of the replicative intermediates and binds to the 5'-end of both duplex and progeny DNA.³³⁻³⁴

The alternative forms of MVM NS-2 have radically different localization and turnover characteristics.³⁵ The efficiency of virus production is strongly affected, in a cell-type specific manner, by mutations in MVM NS-2.³⁶ Moreover, the parvovirus H-1 NS-2 is required for efficient viral proteins synthesis both *in vitro* and *in vivo*.³⁷ As yet, PPV NS-2 has not been studied.

Although it has been reported that the tropism of PPV can be affected by sequences in the NS region,³⁸ we did not observe any differences in the NS protein sequences between NADL-2 and Kresse. The difference in tropism and pathogenicity between these strains seems, therefore, to be located in the capsid.

TROPISM AND HOST RANGE

Parvovirus cell or tissue tropism determinants, host range determinants and determinants which confer hemagglutination properties have all been shown to be located within the capsid proteins^{9,38-47} (reviewed by Truyen and Parrish, this issue). For MVM, fibroblasts are permissive to MVMp while murine T cells are permissive to MVMi. Each strain is restrained to grow on their respective host cell type.⁴⁸ Only two changes in the common VP1/VP2 amino-acid sequence of MVM are required to allow lymphotropic MVMi to grow in fibroblasts like MVMp.^{41-42,44-45} The replication of ADV was also found to be governed by a determinant wholly contained within shared coding sequences of VP1/VP2.⁴⁹

PPV tropism and host range map to the capsid proteins

The high degree of identity (97%) between the Kresse and NADL-2 PPV strains hints that any difference in tropism must map to minor genomic differences (Table 2). The NADL-2 and Kresse strains differ by five amino acids, all of which are located within the VP2 coding region.⁹

We constructed infectious clones of both the NADL-2 and the Kresse strains.^{9,20} Although both viruses reproduced efficiently in PT cells, the Kresse strain, unlike NADL-2, failed to do so in TV (bovine testis) cells.⁹ Based on this observation, chimeric constructs of the infectious clones, in which restriction fragments were exchanged, were transfected into PT cells. Both chimeric viruses obtained from PT cells after transfection were tested on TV cells. Only the virus containing the *Bgl*II fragment of NADL-2 (as indicated in Figure 1) replicates and generates infectious progeny virions on TV cells (Figure 2). Progeny virus obtained from TV cells is infectious in PT and PFT cells. In contrast, NADL-2 clones into which the Kresse *Bgl*II fragment was introduced were infectious in PT or PFT cells but not in TV cells. The *Bgl*II fragment containing the allotropic determinant does not contain silent mutations in addition to the three amino acid changes.⁹

Structure-function relationships of PPV compared to CPV

Capsid protein sequences of 10 representative parvoviruses, aligned against the CPV coordinates obtained from X-ray crystallography, displayed common motifs.⁵⁰⁻⁵¹ Mapping of CPV host range and other characteristics to the overall virion structure indicates that the critical residues are mostly located on the outside of the capsid.⁴⁰ Since CPV and PPV share approximately 60% of amino acid sequence identity for capsid proteins, both sequences can be aligned and compared to predict the location of the critical residues in the PPV VP2 three-dimensional structure.

Conserved structures in parvovirus capsids

A number of structure-function studies of parvoviruses based on sequence similarity have been facilitated by the determination of the three-dimensional structure of CPV.⁵¹ The T=1 icosahedral capsid is composed of 60 protomers (predominantly VP2/3), each of which folds according to the eight-stranded anti-parallel β -barrel structure.⁵¹⁻⁵² Large elaborated loops link most of the strands within the β -barrel and permit intertwining of the protomers. These loops, which make up most of the overall capsid structure, are mostly located at the surface of the virion and are involved in many important biological functions. In addition to immunologically important epitopes, many biochemical functions and other properties can be attributed to residues exposed on the surface of parvovirus capsids.^{39-40,47,53} In fact, the pH dependence of hemagglutination and host range properties discussed earlier map to externally exposed loops.^{40,50-51} Based on the conservation of critical sequences, we can assume that the overall PPV capsid structure is similar to that of CPV.⁵⁰ The reader is referred to the review by Rossmann and Agbandje in this issue for details.

Although comparison between PPV and CPV of exposed loops shows that these regions are more variable (50% identity) than internally located rigid structures like β -sheets and α -helices (70% identity), some loops are nonetheless strictly conserved. Among those

which are probably functionally most relevant are the cylindrical structure, the bulge between β F and β G and the last 25% of loop IV (Figure 3). The cylindrical structure region is highly conserved between CPV and PPV and probably is responsible for stabilizing the overall structure at the five-fold axis. Residues in the bulge between β F and β G are directly involved in binding the viral DNA⁵⁴ and are probably critical since this stretch is identical between CPV and PPV. Finally, the last 50 amino acids of loop IV prior to β H are highly conserved between CPV and PPV. This portion of loop IV is internal and adjacent to the three-fold spike which it might stabilize although this whole structure is probably very flexible.

Mapping of PPV residues involved in tropism

The five amino acid differences between the PPV Kresse and NADL-2 strains map within external loops. Four can be mapped to the surface of the CPV capsid while the fifth, D378G would be near its surface (Figure 4). Three of the four accessible residues are, according to the CPV structure, located within the two-fold depression. Structurally, these residues map to loop II for I215T (VP2 numbering), loop III/IV for D378G and H383Q, C-terminal for R565K. The fifth accessible difference, S436P, is located on top of the three-fold spike within loop IV. This residue is located in the most accessible structure of the capsid and could be involved in tropism. Furthermore, the replacement of a serine residue by a proline at position 436 probably results in a considerable modification of the local topology due to the restraints imposed by its imino acid structure. Chimeric constructs containing this residue (along with two others; Figure 2) enable us to revert the Kresse phenotype to that of the NADL-2 phenotype.⁹

Other exposed residues can be alternatively or coordinately involved in host range as demonstrated in the PPV P2 variant³⁸ where differences in VP2 (N348H, N423D, I564M) map structurally closely to the differences we have observed between NADL-2 and Kresse.⁹ It has also been reported that host range is affected by the coding sequence of the NS1 gene

of the P2 PPV variant generated in the laboratory.³⁸ In contrast, no coding differences were found among the NS genes between PPV NADL-2 and Kresse and the natural allotropic determinant seems to be located in the capsid.

Role of allotropic determinant

The tropism of PPV has been assessed *in vivo* (tissues) and *in vitro* (cell culture).^{9,12} The attachment and entry of PPV occurs in both permissive and non-permissive cells as shown by immunofluorescence and flow cytometry.⁵⁵ There is no systematic correlation between the distribution of viral receptor molecules and the observed permissivity although the absence of such molecules excludes infection (e.g. cells lacking the globoside receptor for B19 are nonpermissive for this virus⁵⁶).

Furthermore, a putative PPV receptor, similar in molecular weight to the one identified for CPV, has been identified in both permissive and non-permissive cells by blocking virus attachment and entry.⁵⁷ Cross-reactivity between the CPV and the putative PPV receptors has not been demonstrated although it has been shown that, in some cases, PPV can enter cells which are permissive for CPV but not PPV.³⁸ This further demonstrates that permissivity is governed intracellularly.

DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PPVs AND PREVENTION

Differential diagnosis

Considering the striking pathogenic differences among PPV strains and the potential risks of vaccines currently used (see next section), it needs hardly to be emphasized that laboratory diagnosis should distinguish the strains for reliable epidemiological surveys and herd management. Classic diagnostic methods based on serologic reactivity to polyclonal antisera

or more recent techniques, such as ELISA⁵⁸ or basic PCR,⁵⁹ are not useful in this respect.

The identification of the allotropic determinant of PPV strains enabled us to design a PCR method that distinguishes the PPV pathogenic/nonpathogenic strains.⁶⁰ In this strategy, two sets of primers are introduced in the PCR amplification cocktail so that either of two possible amplicons with different sizes (indicative of PPV strain) as well as a common amplicon (presence of a PPV) are generated. One of the primers in each set is strain-specific (defined by 3'-nucleotide). To obtain reliable results, we also found it necessary to replace the penultimate 3'-nucleotide in the strain-specific primer. Using this technique, we have recently identified a new virulent PPV from diarrheic pigs.

PPV vaccines

PPV infections are enzootic in most herds and the majority of adult swine have developed immunity to the virus. However, particularly young animals may not yet be protected and, in order to prevent reproductive failure, vaccination prior to breeding is now common. Modified-live vaccine, produced by multiple passages in continuous cell cultures, or chemically inactivated nonvirulent strains (e.g. NADL-2) are widely used. Although these vaccines are apparently protective, they have two important drawbacks. First, it is expensive to propagate PPV in cell culture systems in order to produce a sufficient immunogenic mass. Second, as discussed above, a small mutational change may result in a profound change in tropism or host range of PPV (e.g. the IAF-3 strain isolated from a mummified fetus seems to be a NADL-2 type PPV that lost a repeat (Table 2)).

Recently, the VP2 gene of PPV was expressed by the baculovirus system in insect cells.⁶¹ Expressed proteins spontaneously form capsids and pigs immunized with these virus-like particles elicit an immune response identical to that of a commercial vaccine. Studies with chimeric parvovirus B19 capsids have shown the possibility of adding foreign epitopes to the surface of the virus-like particles.⁶² Multivalent vaccines, a prerequisite in the field, can thus

be designed. Another problem that has to be addressed is the minimization of downstream-processing since animal vaccines become too costly when the ratio of viral immunogenic mass to foreign proteins is too low.

CONCLUSIONS

PPV resembles MVM in several ways with respect to tropism and pathogenesis: (i) the nonpathogenic PPV-NADL-2 and MVMp strains are much less viremic than the pathogenic PPV-NADL-8 and MVMi strains; (ii) the generalized infection of hematopoietic cells, lymphocytes and capillary endothelium for MVMi finds its equivalent in fetal infection for PPV; and, (iii), their strains can be distinguished by an allotropic determinant on the capsid. However, the differences in biology among the PPV groups and the availability of chimeric, infectious clones offer unique tools to investigate the mechanisms of PPV pathogenicity. The confirmation of the localization of the critical amino acids on the capsid and the study of their interaction with host proteins and the host immune system will contribute to a better understanding of PPV biology and an improved control of this important pathogen.

REFERENCES

1. Dunne HW, Gobble JC, Hokanson JR, Kradel DC, Bubash GR (1965) Porcine reproductive failure associated with a newly defined "SMEDI" group of picornaviruses. *Am J Vet Res* 26:1284-1290
2. Mengeling WL, Cutlip RC (1976) Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 37:1393-1400
3. Molitor TW, Joo HS (1990) Clinical and pathological features of porcine-parvovirus-related disease and its diagnosis, in Handbook of Parvoviruses, vol II (Tijssen P, ed) pp 135-150. CRC Press, Boca Raton, FL
4. Dea S, Elazhary MASY, Martineau GP, Vaillancourt J (1985) Parvovirus-like particles associated with diarrhea in unweaned piglets. *Can J Comp Med* 49:343-345
5. Yasuhara H, Matsui O, Hirahara T, Ohgitani T, Tanaka M, Kodama K, Nakai M, Sasaki N (1989) Characterization of a parvovirus isolated from the diarrheic feces of a pig. *Jpn J Vet Sci* 51:337-344
6. Yasuhara H, Matsui O, Hirahara T, Izumida A, Kodama K, Nakai M, Inaba Y (1993) The characteristics of another small DNA virus isolated from a pig with diarrhea. *J Vet Med Sci* 55:1057-1058
7. Cotmore S, Tattersall P (1987) The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* 33:91-174
8. Tijssen P, Bergeron J (1994) Parvoviruses: rodents, pigs, cattle and geese, in Encyclopedia of Virology (Webster RG, Granoff A, eds) pp 1067-1075. Academic Press, San Diego, CA

9. Bergeron J, Hébert B, Tijssen P (1996) Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: Identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* 70:2508-2515
10. Kresse JI, Taylor WD, Stewart WW, Eernisse KA (1985) Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicule-like lesions. *Vet Microbiol* 10:525-531
11. Choi CS, Molitor TW, Joo HS, Gunther R (1987) Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Vet Microbiol* 15:19-29
12. Oraveerakul K, Choi CS, Molitor TW (1993) Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. *Arch Virol* 130:377-389
13. Pattison JR (1990) Parvoviruses: medical and biological aspects, in *Virology*, 2nd edn (Fields BN, Knipe DM *et al*, eds) pp1765-1782. Raven Press, New York
14. Lager KM, Mengeling WL, Liu W (1992) Comparison of the virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. *J Vet Diagn Invest* 4:245-248
15. Clerici M, Shearer GM (1993) The T_H1-T_H2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 14:107-110
16. Clerici M, Shearer GM (1994) The T_H1-T_H2 hypothesis of HIV infection: new insights. *Immunol Today* 15:575-581
17. Molitor TW, Joo HS, Collett MS (1984) Porcine parvovirus DNA: Characterization of the genomic and replicative form DNA of two virus isolates. *Virology* 137:241-254
18. Ranz AI, Manclus JJ, Diaz-Aroca E, Casal JI (1989) Porcine parvovirus: DNA sequence and genome organization. *J Gen Virol* 70:2541-2553

19. Vasudevacharya J, Basak S, Srinivas RV, Compans RW (1990) The complete nucleotide sequence of an infectious clone of porcine parvovirus, strain NADL-2. *Virology* 178:611-616
20. Bergeron J, Menezes J, Tijssen P (1993) Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* 197:86-98
21. Sakurai M, Nishimoro T, Ushimi C, Nakajima H (1989) Nucleotide sequence of capsid gene of porcine parvovirus. *Virus Res* 13:79-86
22. Gu Z, Plaza S, Perros M, Cziepluch C, Rommelaere J, Cornelis JJ (1995) NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. *J Virol* 69:239-246
23. Cotmore SF, Tattersall P (1994) An asymmetric nucleotide in the parvoviral 3' hairpin directs segregation of a single active origin of DNA replication. *EMBO J* 13:4145-4152
24. Sachs AB (1993) Messenger RNA degradation in eukaryotes. *Cell* 74:413-421
25. Astell CR, Gardiner EM, Tattersall P (1986) DNA sequence of the lymphotropic variant of minute virus of mice, MVMi, and comparison with the DNA sequence of the fibrotropic prototype strain. *J Virol* 57:656-669
26. Salvino R, Skiadopoulos M, Faust EA, Tam P, Shade RO, Astell CR (1991) Two spatially distinct genetic elements constitute a bipartite DNA replication origin in the minute virus of mice genome. *J Virol* 65:1352-1363

27. Oraveerakul K, Chang CS, and Molitor TW (1992) Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J Virol* 66:715-722
28. Gu ML, Chen FX, and Rhode SL (1992) Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), and SP1 site, and TATA box for full activity. *Virology* 187:10-17
29. Molitor TW, Joo HS, Collett MS (1984) Isolation and identification of a nonstructural protein from porcine parvovirus infected cells. *J Virol* 55:554-559
30. Hébert B, Tijssen P (1995) Unpublished results
31. Krady JK, Ward DC (1995) Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol Cell Biol* 15:524-533
32. Legendre D, Rommelaere J (1994) Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 68:7974-7985
33. Cotmore SF, Tattersall P (1989) A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles *J Virol* 63:3902-3911
34. Liu Q, Yong CB, Astell CR (1994) In vitro resolution of the dimer bridge of the minute virus of mice (MVM) genome supports the modified rolling hairpin model for MVM replication. *Virology* 201:251-262
35. Cotmore SF, Tattersall P (1990) Alternate splicing in a parvovirus nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localisation and turnover characteristics. *Virology* 177:477-487

36. Naeger LK, Carter J, Pintel DJ (1990) The small nonstructural protein (NS-2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J Virol* 64:6166-6175.
37. Li X, Rhode SL (1991) Nonstructural protein NS-2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cell in vivo and in vitro. *Virology* 184:117-130
38. Vasudevacharya J, Compans RW (1992) The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology* 187:515-524
39. Parrish CR (1991) Mapping specific functions in the capsid structure of canine parvovirus and feline panleukopenia virus using infectious plasmid clones. *Virology* 183:195-205
40. Chang SF, Sgro JY, Parrish CR (1992) Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol* 66:6858-6867
41. Gardiner EM, Tattersall P (1988) Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J Virol* 62:1713-1722
42. Gardiner EM, Tattersall P (1988) Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* 62:2605-2613
43. Spalholz BA, Tattersall P (1983) Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependant target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* 46:937-943

44. Ball-Goodrich LJ, Moir RD, Tattersall P (1991) Parvoviral target cell specificity: acquisition of fibrotropism by a mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice involves multiple amino acid substitutions within the capsid. *Virology* 184:175-186
45. Ball-Goodrich LJ, Tattersall P (1992) Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mouse. *J Virol* 66:3415-3423
46. Parrish CR, Aquadro CF, Carmichael LE (1988) Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* 166:293-307
47. Truyen U, Parrish CR (1992) Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J Virol* 66:5399-5408
48. McMaster GK, Beard P, Engers HD, Hirt B (1981) Characterization of an immunosuppressive parvovirus related to minute virus of mice. *J Virol* 38:317-326
49. Bloom ME, Berry BD, Wei W, Perryman S, Wolfenbarger JB (1993) Characterization of chimeric full-length molecular clones of Aleutian Mink disease parvovirus (ADV): Identification of a determinant governing replication in cell culture. *J Virol* 67:5976-5988
50. Chapman MS, Rossmann MG (1993) Structure, sequence, and function relationship correlations among parvoviruses. *Virology* 194:491-508

51. Tsao J, Chapman MS, Agbandje M, Keller W, Smith K, Wu H, Luo M, Smith TJ, Rossmann MG, Compans RW, Parrish CR (1991) The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* 251:1456-1464
52. Lilius L (1991) Structure of spherical viruses. *Int J Biol Macromol* 13:273-280
53. Strassheim ML, Gruenberg A, Veijalainen P, Sgro JY, Parrish CR (1994) Two dominant neutralizing antigenic determinants of canine parvovirus are found on the three fold spike of the virus capsid. *Virology* 198:175-184
54. Chapman MS, Rossmann MG (1995) Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus. *Structure* 3:151-162
55. Ridpath JF, Mengeling WL (1988) Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res* 10:17-28
56. Gallinella G, Anderson M, Young NS, Brown KE (1995) Human parvovirus B19 can infect cynomolgus monkey marrow cells in tissue culture. *J Virol* 69:3897-3899
57. Harding MJ, Molitor TW (1992) A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Arch Virol* 123:323-333
58. Jenkins CE (1992) An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues. *J Virol Meth* 39:179-184
59. Molitor TW, Oraveerakul K, Zhang QQ, Choi CS, Ludemann LR (1991) Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J Virol Meth* 32:201-211

60. Dubuc R, Bergeron J, Marsolais G, Tijssen P (1995) Unpublished results
61. Martinez C, Dalsgaard K, Lopez de Turiso JA, Cortes E, Vela C, Casal JI (1992)
Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity.
Vaccine 10:684-690
62. Brown CS, Welling-Wester S, Feulbrief M, Van Lent JWM, Spaan WJM (1994)
Chimeric parvovirus B19 capsids for the presentation of foreign epitopes. *Virology*
198:477-488

TABLE 1

Pathogenicity of Four Porcine Parvovirus Isolates in Swine

Isolate	Original source	Placental transmission	Fetal death following experimental infection			
			<i>per os</i>		<i>in utero</i>	
			<10 weeks	>10 weeks ^a	<10 weeks	>10 weeks
KBSH	Normal KB cells	No	No	No	No	No
NADL-2	Normal leukocytes	No	No	No	Yes	No
NADL-8	Mummified fetuses	Yes	Yes	No	Yes	No ^b
Kresse	Vesicular lesions	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes ^b

Adapted from Molitor and Joo³

^a Fetuses older than 70 days of gestation are normally immunocompetent.

^b Relative concentrations of RF DNA in organs of Kresse-infected fetuses compared to NADL-8-infected fetuses:¹²

liver, lung and heart, from 1 to 3-fold; kidney and gastro-intestinal tract, almost 10-fold; brain and spleen, about 30-fold

Table 2. Amino acid mutations in the predicted VP-2 of different PPV strains and field isolates.

Numbers refer to positions in NADL-2 VP-2 amino acids sequence. Consistent mutations are indicated in bold. All field isolates came from mummified fetuses, except for IAF-A54 and IAF-22 that were isolated from skin lesions and normal porcine thyroid gland, respectively. nd, not done.

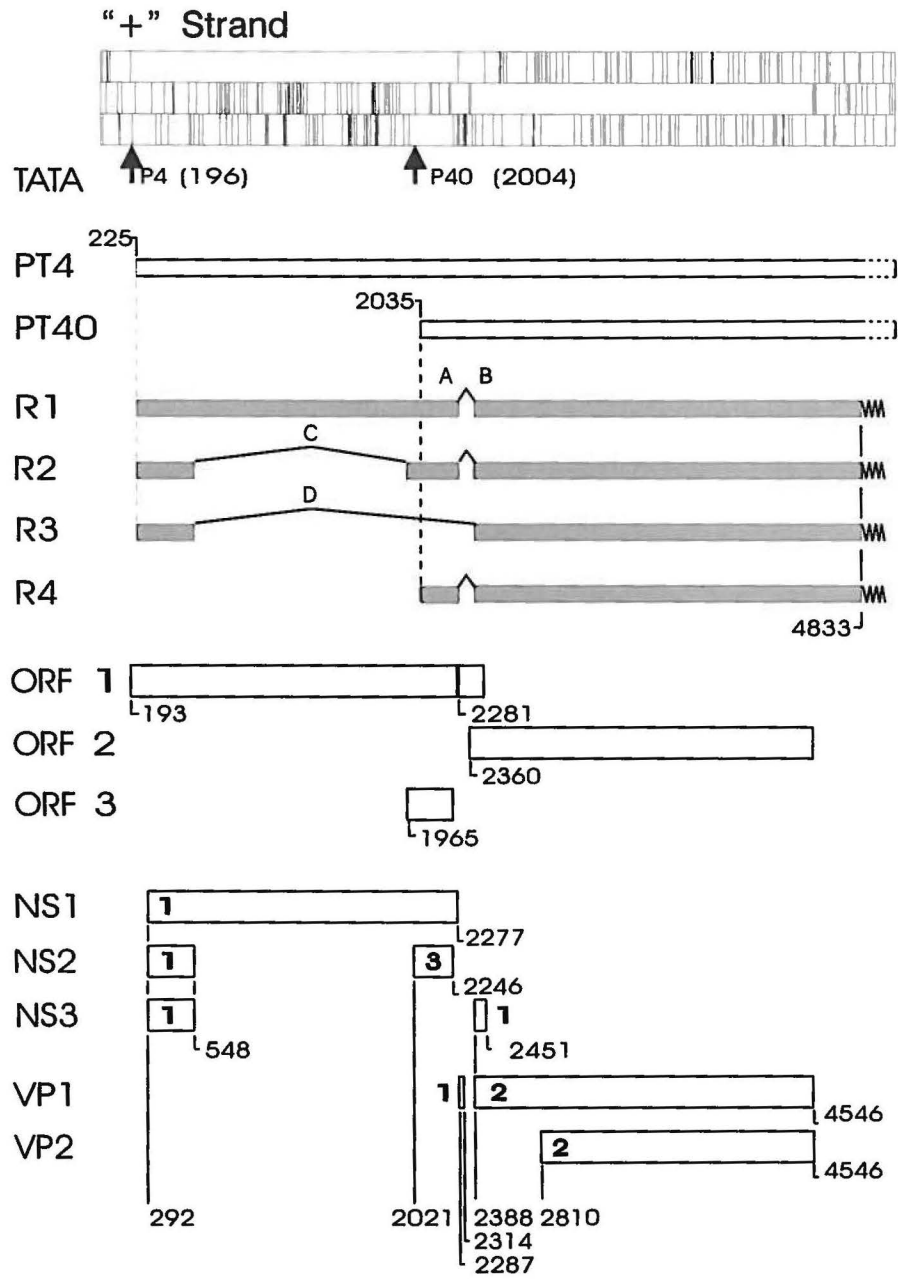
Isolates	215	320	342	359	373	378	383	435	436	467	485	565	576	Repeat
NADL-2	I	I	M	T	I	D	H	K	S	D	V	R	K	+
IAF-3			T		K									-
Kresse	T					G	Q		P			K		-
IAF-A54	T					G	Q		P			K		-
90HS	T	M				G	Q		P			K		-
IAF-22	T			A		G	Q		P		A	K		-
IAF-28	nd					G	Q		P			K		-
IAF-76	nd					G	Q	E	P	V		K	N	-

Figure 1.

(A) Information flow from DNA to viral proteins.²⁰ The protein coding regions cover four ORFs. Aside from the two large ORFs, two small ORFs are also present. The first small ORF is located immediately downstream of the first large ORF and codes for the N-terminal portion of VP-1 and the C-terminal portion of NS-3. The second small ORF, located in the third frame, coincides with the P40 promoter and codes for the C-terminus of NS-2. Transcripts are synthesized from nts 225 and 2035 of the "-" strand and polyadenylated at position 4833. Four different splicing patterns (A, 2281/2388; B, 2314/2388; C, 548/2021; and D, 548/2388) were distinguished resulting in 4.7 kb (R1), 3.3 kb (R2), and 2.9 kb (R3 and R4) transcripts. Superimposing the ORFs on the processed transcripts predicted three NS and two VP translation products (numbers correspond to the first and last nucleotide in each exon and the numbers inside or beside the box refer to the reading frame). The VP-1/2 *Bg/II-Bg/II* fragment containing the amino acids 378D, 383H and 436S (VP-2 numbering) is also illustrated. Roman numerals above the NS-1 transcription product indicate regions defined as an initiator protein motif (I) and superfamily III helicase motif (II).

(B) Difference in splicing patterns of VP proteins between PPV and MVM. Whereas MVM has two splicing acceptor sites in the right ORF, PPV has only one. However, this difference in splicing will not affect the strategy of expression as shown by translated regions (bold line, VP1; double-bold line, VP2). The strategy of NS-2 expression differs considerably between PPV and MVM. For MVM, NS-2 may have different C-terminal extensions (a, b, and albeit rarely, c). In contrast, PPV-NS-2 terminates upstream from the VP splicing sites and a separate NS-3 is generated by splicing the NS-2 site donor site at 547-CG/GC to the VP acceptor site.

A



B

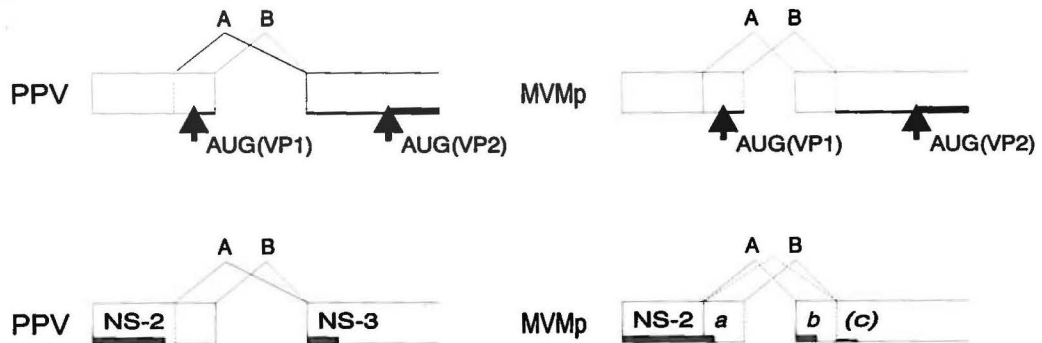


Figure 2. Chimeric constructs resulting from restriction fragment exchange between PPV Kresse and NADL-2 infectious clones. Progeny virions, obtained after transfection of PT cells, were titered on PT cells and TV cells. Only virions containing the *Bgl* II from NADL-2 replicate in TV cells while all replicate on PT cells.

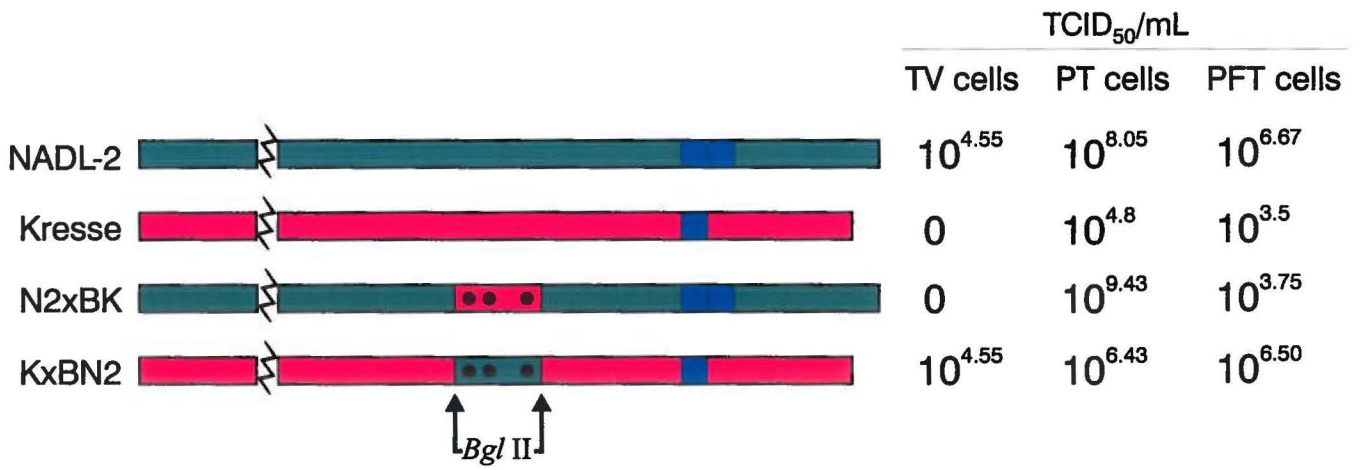


Figure 3. Mapping of critical PPV residues to the secondary structure of CPV. The principal β -strands (A-I) and α -helices (α A and α B) are shown as arrows and coils, respectively. (Adapted from ref 50) Differences between NADL-2 and Kresse are indicated by circles while residues which characterize the P2 variant are indicated by diamonds. Numbers in parentheses indicate corresponding CPV residues.

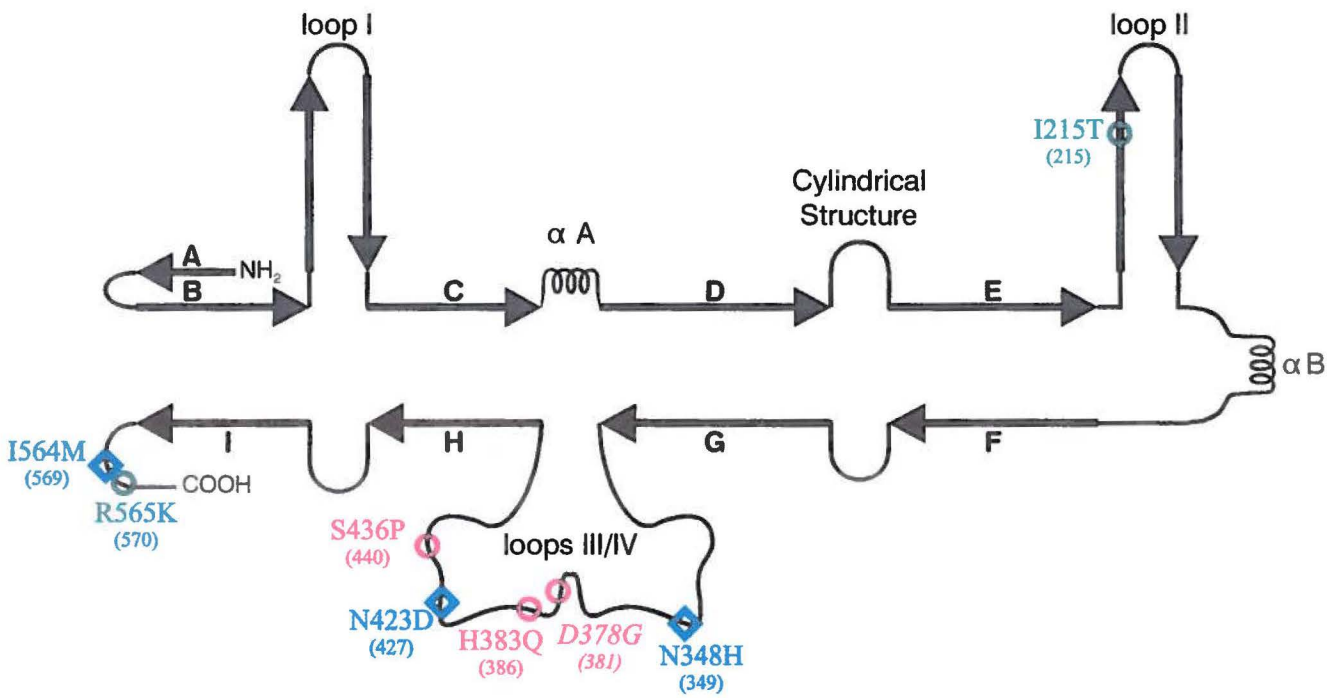


Figure 4. Schematic representation of the RoadMap diagram for capsomers adapted from the CPV capsid structure.⁵¹

Note that critical amino acid substitutions between PPV NADL-2 and Kresse are located in areas different from that of other parvoviruses but are prominently exposed. Circles indicate changes which characterize the Kresse strain and diamonds, the P2 variant, as compared to the NADL-2 strain.

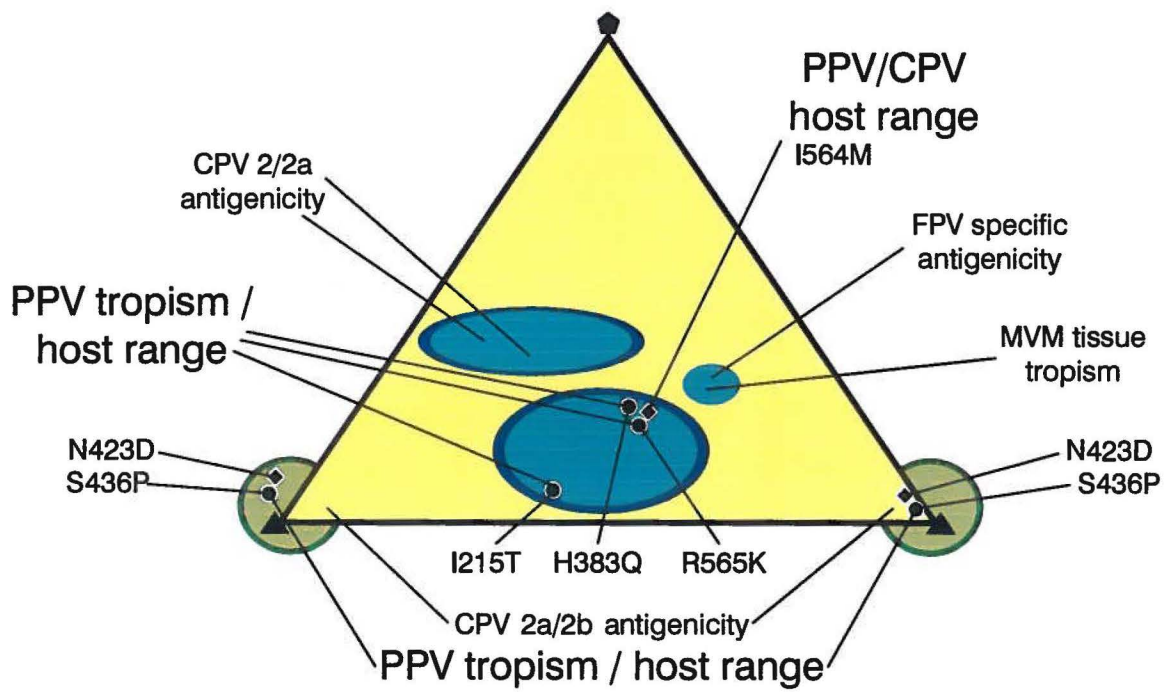
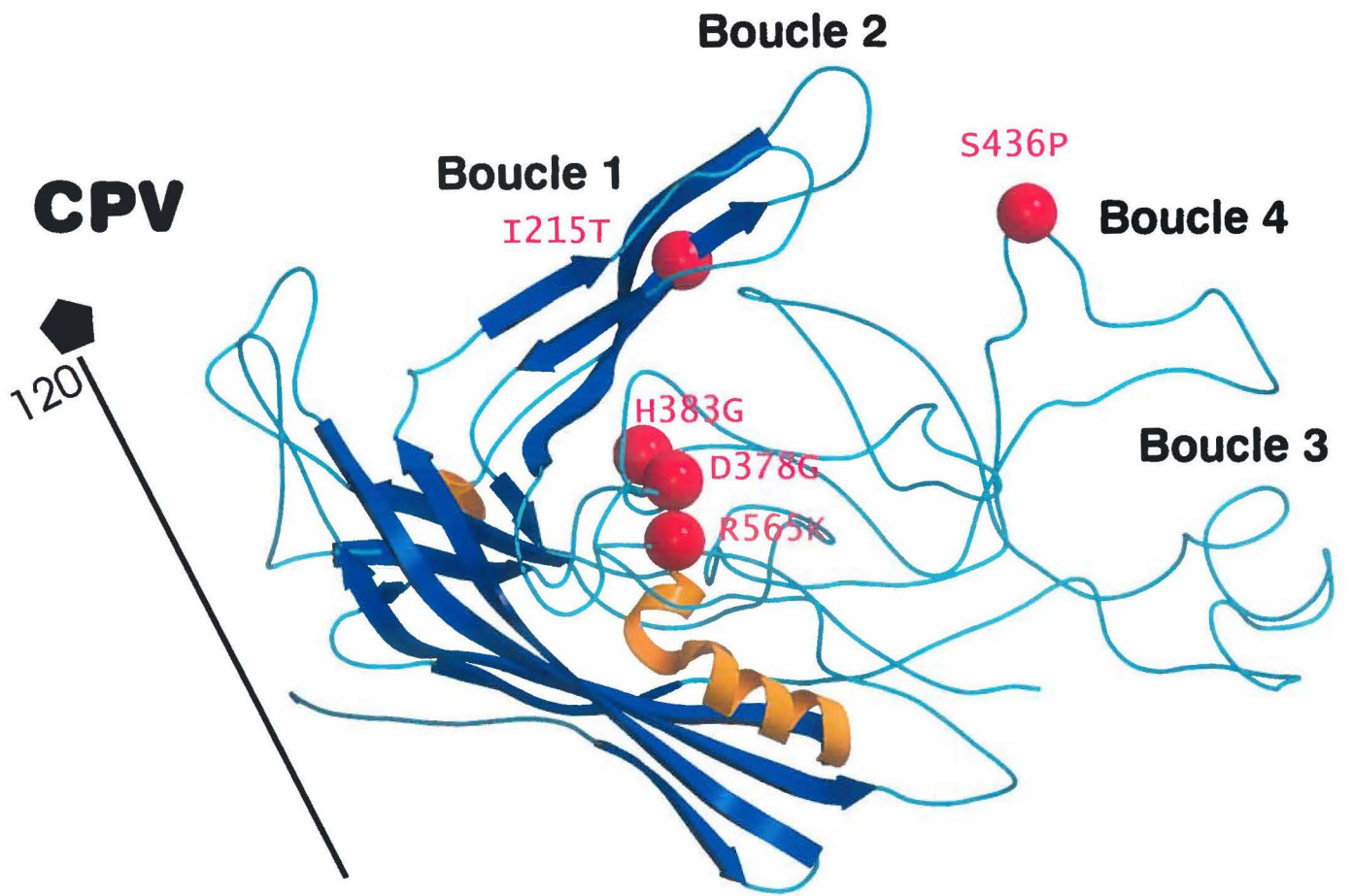


Figure 5. Localisation des résidus qui diffèrent entre Kresse et NADL-2 projetés sur la structure secondaire de CPV.



RELATION STRUCTURE-FONCTION: MISE À JOUR DES CONNAISSANCES

INTRODUCTION

L'infection d'une cellule par un virus est déclenchée par une succession d'événements propres à chaque système. Par contre, les grandes étapes peuvent être définies en terme d'interactions entre le virus et la surface cellulaire (attachement), d'entrée du virus dans la cellule par divers mécanismes d'endocytose (pénétration), de transport intracellulaire du virus, de décapsidation et finalement, de la mise en oeuvre du cycle viral proprement dit: réplication du génome viral, transcription et traduction des gènes viraux, encapsidation et libération du virus.

La susceptibilité d'une cellule à être infectée dépend de l'entrée du virus. C'est à la suite de cette étape qu'il devient important de décrire le sort de la cellule en fonction de conventions. Les cellules permissives supportent l'infection productive de virus, c'est-à-dire que l'ensemble des fonction virales permettent la production de particules virales infectieuses alors que les cellules non permissives ne le permettent pas. Les cellules qui peuvent être infectées ne supportant pas la production de particules infectieuses sont dites restrictives. Il est important de souligner que, tout comme dans le cas des infections par les parvovirus, certaines cellules peuvent être dans un stade transitoire de restriction lorsqu'elles ne sont pas en phase S du cycle cellulaire. Il en serait de même si l'expression transitoire d'une protéine transmembranaire empêchait l'infection virale.

Étant donné l'importance des interactions virus-cellules, la dernière partie de cette discussion présentera un rappel de certains résultats portant sur le tropisme viral en les comparant avec d'autres modèles viraux. De plus, les orientations actuelles des projets portant sur le parvovirus porcine seront brièvement discutées tout en introduisant certains résultats et travaux qui n'ont pas été présentés dans le cadre de cette thèse.

DISCUSSION

Avant d'entreprendre ces travaux, nous supposions que des différences génomiques entre les souches virulentes et avirulentes étaient reliées indirectement aux pathologies observées cliniquement. Par analogie avec CPV et MVM, notre attention allait porter sur les gènes de la capsid virale bien que nous étions conscients de l'importance des autres gènes viraux et des régions non codantes. Ces dernières sont relativement complexes chez les parvovirus, étant toujours multi-fonctionnelles principalement dans un souci d'économie d'utilisation du génome.

Nos travaux avaient pour but de déterminer les différences moléculaires qui caractérisent les souches de parvovirus porcin. Nous avons entrepris de déterminer ces différences par séquençage partiel d'isolats cliniques ainsi que par le séquençage complet d'une souche très pathogénique, la souche Kresse. Nos travaux ont démontré que des différences systématiques existent au niveau de la capsid. Le séquençage de la souche Kresse permet de constater que toutes les différences codantes retrouvées chez ce virus se situent dans le gène de la capsid. De plus, des chimères de virus permettent de confirmer le rôle de la capsid dans un système *in vitro*. Bien que nous n'avons pas encore déterminé la structure du PPV, nos résultats nous permettent de situer, par analogie avec CPV, la position des différences observées entre les souche NADL-2 et Kresse (Figure 5).

En supposant que l'organisation des boucles de surface est similaire chez le PPV, sauf pour ce qui est du changement localisé sur la protubérance, les autres changements sont localisés dans la région (dépression) où plusieurs résidus de CPV sont impliqués dans le spectre d'hôte et l'hémagglutination. Cette région est très flexible et ne semble pas adopter de conformation fixe chez CPV ou FPV. En fait, suite aux résultats obtenus en cristallographie, cette portion de la boucle adopte deux positions très distinctes et, contrairement aux hypothèses émises initialement, ne semble pas reliée au tropisme (A. Simpson, communication personnelle).

Orientation actuelle du projet

Les travaux présentés ici s'insèrent dans une problématique d'étude du tropisme viral des parvovirus où deux systèmes principaux sont exploités, soit le parvovirus porcine et les densovirus.

Alors que la caractérisation du déterminant tropique sera effectuée plus finement par mutagenèse dirigée grâce aux méthodes présentées au préalable ainsi qu'éventuellement, à l'aide de la structure tridimensionnelle du PPV, un raffinement du système *in vitro* est essentiel afin de permettre de mieux cerner l'impact des résidus de la capsid du PPV qui font ou feront l'objet d'études approfondies.

Le système cellulaire que nous avons développé pour ces travaux comportait une faiblesse, tenant au fait qu'il s'agissait de cellules de cultures primaires. Bien que les résultats soient reproductibles d'un lot de cellules à l'autre, il serait préférable de travailler avec des populations de cellules plus homogènes. Des cellules TV ont récemment été transformées et clonées. Il est important de souligner que les différents clones obtenus reflètent les populations observées dans les cultures mixtes, c'est-à-dire qu'ils peuvent être classifiés en cellules permissives, non permissives ou permissives seulement aux souches avirulentes (Laakel, M. *et al.*, en préparation). Ces cellules permettront de développer un modèle de tropisme *in vitro* où les étapes importantes du cycle viral pourront être étudiées plus facilement.

Bien que le mode d'entrée du PPV ne soit pas identifié, l'attachement à une molécule cellulaire est probablement essentiel. Afin de déterminer la ou les régions de la capsid responsables de l'attachement du virus à la cellule, des études de compétition avec des anticorps monoclonaux neutralisants demeurent la méthode de choix. Ces études permettent de caractériser les épitopes du virus en plus de permettre d'isoler des mutants échappatoires après avoir cultivé le virus en présence d'anticorps neutralisants. À cette fin, un des premiers lots de virus purifié produit dans le cadre de ce projet a été utilisé pour la fabrication

d'anticorps monoclonaux (Hébert, B. *et al.*, non publié). Il nous a été possible d'obtenir sept hybridomes. Des résultats préliminaires indiquent que deux clones reconnaissent potentiellement la partie unique de VP1 alors que les autres sont spécifiques pour VP2 (Hébert, B. *et al.*, non publié).

En plus des anticorps monoclonaux, des travaux sont également en cours afin d'identifier les protéines pouvant interagir avec la capsid virale, à l'aide du système double-hybride. Ces résultats permettront de continuer la caractérisation des étapes menant à une infection productive dans différentes lignées et également d'étudier les voies pouvant bloquer l'infection. Il semble que plusieurs paramètres soient responsables du contrôle de l'infection et que ceux-ci varient selon les lignées cellulaires. L'utilisation simultanée des clones de cellules TV transformées et des mutants viraux, tout en relation avec les études structurales, permettra de mieux comprendre quels sont les mécanismes de restriction.

L'importance du projet sur le tropisme du parvovirus porcin réside dans la complexité des interactions virus-cellule. Étant donné que les particules virales pénètrent autant chez les cellules permissives que non permissives, l'attachement est soit polyvalent ou alors sans conséquence dans le cycle viral.

Dans l'étude du tropisme viral, plusieurs facteurs peuvent influencer la capacité d'un virus à mener une infection productive. Le type cellulaire et le stade de différenciation peuvent faire en sorte que les facteurs cellulaires nécessaires dans le cycle infectieux ne sont pas exprimés.

Par exemple, un type cellulaire pourrait permettre l'internalisation du virus mais la transcription d'un gène codant pour une protéine cellulaire essentielle dans le cycle infectieux serait sous le contrôle d'un promoteur inactif dans cette cellule. On peut élargir ce principe aux interactions protéine-protéine, aux mécanismes de transport du virus, à la décapsidation et au besoin particulier de protéines chaperonnes dans l'assemblage de la capsid.

Le stade de développement de l'hôte peut également entrer dans le modèle. En effet, à ma connaissance, l'importance du stade de différenciation des cellules infectées par le PPV n'a jamais été étudié. La seule explication simpliste concerne le cycle cellulaire des cellules embryonnaires. Dans ce cas particulier, les cellules dans un stade de développement précoce n'entrent pas dans les phases G₁ et G₂ mais plutôt dans une alternance de phases M et S. La machinerie cellulaire en place durant la phase S supporterait l'infection. Par contre, le stade de différenciation fait en sorte que très peu de molécules de surface, pouvant agir comme récepteurs viraux, sont exprimées dans ces cellules. Le mode de pénétration doit quand même être très efficace en leur absence. En fait, je considère que les parvovirus présentent des modèles probablement uniques pour l'étude du tropisme, principalement parce que contrairement à plusieurs autres virus, le tropisme n'est pas régulé par la présence ou l'absence d'une protéine transmembranaire à la surface de la cellule.

En guise de comparaison, citons l'exemple des rhinovirus dont deux grandes catégories de sérotypes sont définies en fonction de leur capacité à pénétrer à l'intérieur de la cellule hôte soit en se liant à la molécule ICAM-1 dans le premier cas (Greve *et al*, 1989) ou au LDL-R dans le deuxième cas (Hofer *et al*, 1994). Bien que dans ce cas, aucune pathologie grave n'est associée au rhinovirus du groupe mineur (LDL-R), le cas du virus causant la poliomyélite est très différent. En fait, la souche virulente peut se répliquer dans les tissus intestinaux et dans les tissus composant le système nerveux central (SNC). La souche vaccinale Sabin diffère au niveau du tropisme tissulaire car cette souche n'est pas neurovirulente mais peut quand même infecter les cellules intestinales d'où son pouvoir immunogène (Nomoto et Wimmer, 1987). La différence de tropisme n'est pas causée par l'impossibilité d'infecter des cellules du SNC mais plutôt par l'instabilité de cette souche qui ne cause pas de paralysie. En fait, une seule mutation codante, située dans la protéine VP3 (93S→F), est responsable des différences observées (Minor *et al*, 1989). Son rôle demeure encore imprécis mais les résultats suggèrent fortement que la mutation perturbe les interactions intraprotomères et interpentamères (Macadam *et al*, 1989, 1991).

PERSPECTIVES

Le parvovirus porcin, en plus d'être un modèle d'étude du tropisme des parvovirus, demeure un problème économique important pour les éleveurs qui sont d'autant plus concernés par l'apparition de nouvelles souches associées à des pathologies encore plus graves. Malheureusement, les travaux présentés ici ne permettent pas d'associer directement le tropisme observé *in vitro* aux pathologies. Par contre, les résultats du groupe de Molitor ayant démontré la pathogénicité et la virulence élevée de la souche Kresse, comparativement à la souche NADL-2, permettent de suggérer que les observations que nous avons faites *in vitro* sont fidèles au modèle. Il est important de pouvoir procéder à des expériences *in vivo* avec les virus chimériques et mutants que nous avons créés en laboratoire afin de vérifier cette hypothèse. Par contre, de tels travaux comportent un risque d'introduction de souches potentiellement néfastes et doivent être effectués dans des conditions où les risques sont minimisés.

En plus des problèmes associés au cheptel porcin, le parvovirus porcin connaît un regain de popularité à cause du danger potentiel qu'il représente dans les xénogreffes. En effet, à cause de sa très grande résistance et du potentiel qu'il possède à changer de tropisme, il présente un problème d'actualité.

Au cours des deux dernières années, l'équipe du professeur Tijssen a été impliquée dans des travaux visant à mettre au point des méthodes de détection du PPV à la fois spécifiques et sensibles. Le défi était de taille car le matériel est un dérivé sanguin, soit le facteur VIII porcin (Hyate:C, Ipsen, UK). Les problèmes d'inhibition ont pu être résolus et les méthodes actuelles permettent de détecter moins de 50 copies de génome à partir d'un microlitre de plasma.

À ce jour, il demeure impossible d'assurer que des quantités non détectables de parvovirus porcin dans de tels produits sont sécuritaires. Jusqu'à maintenant, des résultats *in vitro* suggèrent que plus d'une particule infectieuse est requise pour infecter une cellule. Par contre,

les mécanismes d'attachement et d'entrée étant toujours inconnus, il est difficile de prédire l'importance de telles particules au niveau sanguin d'autant plus que le PPV possède une très grande stabilité. Ces problèmes reliés à la xénotransplantation ne sauront être résolus tant que les mécanismes régissant le tropisme du parvovirus porcin ne seront élucidés.

REMERCIEMENTS

La recherche n'est pas faite pour être menée seule. Les travaux présentés ici ont donc été influencés par plusieurs collègues et je me permettrai de souligner l'apport de ceux-ci.

En premier lieu, j'adresse mes sincères remerciements au professeur Peter Tijssen pour avoir accepté de diriger mes travaux de doctorat. Il m'a aidé à me dépasser et m'a aussi donné le goût de comprendre. Je dois également souligner à quel point j'apprécie d'avoir eu la possibilité de présenter mes travaux dans plusieurs des congrès internationaux.

Je remercie également tous les membres, antérieurs ou actuels, de l'équipe du professeur Tijssen qui ont fait en sorte que ces dernières années resteront à jamais gravées dans ma mémoire.

De ceux qu'il ne faut jamais oublier, je remercie particulièrement le docteur Jean Bergeron, collègue et ami, qui m'a initié aux doux plaisirs de la biologie moléculaire.

Au cours de toutes les années passées à l'Institut Armand-Frappier, j'ai eu la chance de côtoyer de nombreuses personnes, trop nombreuses pour les nommer, qui ont fait en sorte que mon séjour soit des plus plaisants.

Un merci particulier à mon père, Gilles, qui m'a tôt enseigné l'importance de la persévérance et qui m'a laissé faire mes propres choix.

Je n'aurais jamais réalisé ces travaux si ce n'était de Marie-Claude, mon épouse, qui a toujours su m'encourager et me supporter dans les moments difficiles. C'est pour cette raison que je lui dédie cet ouvrage.

Finalement, je remercie l'Institut Armand-Frappier ainsi que la Fondation Armand-Frappier pour m'avoir octroyé des bourses d'études pour mes travaux de doctorat.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Agbandje, M., Kajigaya, S., McKenna, R., Young, N. S. et Rossmann, M. G. 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology* **203**(1): 106-15.
- Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M. G., Strassheim, M. L. et Parrish, C. R. 1993. Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins* **16**(2): 155-71.
- Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A. L., Wang, F., Tattersall, P. et Rossmann, M. G. 1998. Functional Implications of the Structure of the Murine Parvovirus, Minute Virus of Mice. *Structure* **6**(11): 1369-1381.
- Avalosse, B., Dupont, F., Spegelaere, P., Mine, N. et Burny, A. 1996. Method for concentrating and purifying recombinant autonomous parvovirus vectors designed for tumour-cell-targeted gene therapy. *Journal of Virological Methods* **62**(2): 179-83.
- Barbis, D. P., Chang, S. F. et Parrish, C. R. 1992. Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* **191**(1): 301-8.
- Basak, S. et Compans, R. W. 1989. Polarized entry of canine parvovirus in an epithelial cell line. *Journal of Virology* **63**(7): 3164-7.
- Basak, S. et Turner, H. 1992. Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology* **186**(2): 368-76.
- Basak, S., Turner, H. et Parr, S. 1994. Identification of a 40- to 42-kDa attachment polypeptide for canine parvovirus in A72 cells. *Virology* **205**(1): 7-16.

- Bergeron, J., Hebert, B. et Tijssen, P. 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *Journal of Virology* **70**(4): 2508-15.
- Bergeron, J., Menezes, J. et Tijssen, P. 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* **197**(1): 86-98.
- Brown, K. E., Anderson, S. M. et Young, N. S. 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262** (5130): 114-7.
- Chang, S. F., Sgro, J. Y. et Parrish, C. R. 1992. Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *Journal of Virology* **66**(12): 6858-67.
- Chapman, M. S. et Rossmann, M. G. 1993. Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**(2): 491-508.
- Chipman, P. R., Agbandje-McKenna, M., Kajigaya, S., Brown, K. E., Young, N. S., Baker, T. S. et Rossmann, M. G. 1996. Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(15): 7502-6.
- Choi, C. S., Molitor, T. W., Joo, H. S. et Gunther, R. 1987. Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Veterinary Microbiology* **15**(1-2): 19-29.
- Gardiner, E. M. et Tattersall, P. 1988. Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *Journal of Virology* **62**(8): 2605-13.

- Glomb-Reinmund, S. et Kielian, M. 1998. The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus. *Virology* **248**(2): 372-81.
- Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W. et Helenius, A. 1997. The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO Journal* **16**(19): 5998-6007.
- Greber, U. F., Webster, P., Weber, J. et Helenius, A. 1996. The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO Journal* **15**(8): 1766-77.
- Greber, U. F., Willetts, M., Webster, P. et Helenius, A. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**(3): 477-86.
- Greve, J.M., C.P. Forte, C.W. Marlor, A.M. Meyer, H. Hooverlitty, D. Wunderlich et A. McClelland. 1991. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**:839-847.
- Harding, M. J. et Molitor, T. W. 1992. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Archives of Virology* **123**(3-4): 323-33.
- Hofer, F., M. Gruenberger, H. Kowalski, H. Machat, M. Huettinger, E. Kuechler et D. Blaas. 1994. Members of the low density lipoprotein receptor family mediate cell entry of a minor group common cold virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**:1839-1842.
- Irurzun, A., Nieva, J. L. et Carrasco, L. 1997. Entry of Semliki forest virus into cells: effects of concanamycin A and nigericin on viral membrane fusion and infection. *Virology* **227**(2): 488-92.
- Kresse, J. I., Taylor, W. D., Stewart, W. W. et Eernisse, K. A. 1985. Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Veterinary Microbiology* **10**(6): 525-31.

- Kronenberger, P., Schober, D., Prchla, E., Ofori-Anyinam, O., Vrijisen, R., Rombaut, B., Blaas, D., Fuchs, R. et Boeye, A. 1998. Uptake of poliovirus into the endosomal system of HeLa cells. *Archives of Virology* **143**(7): 1417-24.
- Li, S. et Wilkinson, M. F. 1997. Site-directed mutagenesis: a two-step method using PCR and *Dpn* I. *Biotechniques* **23**: 588-90.
- Macadam, A.J., S.R. Pollard, G. Ferguson, G.Dunn, R. Skuce, J.W. Almond, et P.D. Minor. 1989. Reversion of attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccines. *Virology* **174**:408-414.
- Macadam, A.J., G. Ferguson, C. Arnold et P.D. Minor. 1991. An assembly defect as a result of an attenuating mutation in the capsid proteins of the poliovirus type 3 vaccine strain. *Journal of Virology* **65**:5225-5231.
- Minor, P.D., G. Dunn, D.M.A. Evans, D.L. Magrath, A. John, J. Howlett, A. Phillips, G. Westrop, K. Wareham, J.W. Almond, et J.M. Hogle. 1989. The temperature-sensitivity of the Sabin type 3 vaccine of poliovirus: molecular and structural effects of mutation in the capsid gene protein VP3. *Journal of General Virology* **70**:1117-1123.
- Molitor, T. W., Joo, H. S. et Collett, M. S. 1983. Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *Journal of Virology* **45**(2): 842-54.
- Nomoto, A. et E. Wimmer. 1987. Genetic studies of the antigenicity and the attenuation phenotype of poliovirus. *Symposium of the Society of General Microbiology* **35**:107

- Oie, K. L., Durrant, G., Wolfenbarger, J. B., Martin, D., Costello, F., Perryman, S., Hogan, D., Hadlow, W. J. et Bloom, M. E. 1996. The relationship between capsid protein (VP2) sequence and pathogenicity of Aleutian mink disease parvovirus (ADV): a possible role for raccoons in the transmission of ADV infections. *Journal of Virology* **70**(2): 852-61.
- Oleksiewicz, M. B., Wolfenbarger, J. B. et Bloom, M. E. 1998. A comparison between permissive and restricted infections with Aleutian mink disease parvovirus (ADV) - characterization of the viral protein composition at nuclear sites of virus replication. *Virus Research* **56**(1): 41-51.
- Oraveerakul, K., Choi, C. S. et Molitor, T. W. 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *Journal of Virology* **66**(2): 715-22.
- Palokangas, H., Metsikko, K. et Vaananen, K. 1994. Active vacuolar H⁺ATPase is required for both endocytic and exocytic processes during viral infection of BHK-21 cells. *Journal of Biological Chemistry* **269**(26): 17577-85.
- Parker, J. S. et Parrish, C. R. 1997. Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *Journal of Virology* **71**(12): 9214-22.
- Parrish, C. R., Aquadro, C. F., Strassheim, M. L., Evermann, J. F., Sgro, J. Y. et Mohammed, H. O. 1991. Rapid antigenic-type replacement and DNA sequence evolution of canine parvovirus. *Journal of Virology* **65**(12): 6544-52.
- Parrish, C. R., Have, P., Foreyt, W. J., Evermann, J. F., Senda, M. et Carmichael, L. E. 1988. The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *Journal of General Virology* **69** (Pt 5): 1111-6.
- Perez, L. et Carrasco, L. 1993. Entry of poliovirus into cells does not require a low-pH step. *Journal of Virology* **67**(8): 4543-8.

- Ridpath, J. F. et Mengeling, W. L. 1988. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Research* **10**(1): 17-27.
- Rossmann, M. G. et Johnson, J. E. 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annual Reviews of Biochemistry* **58**: 533-73.
- Schwarz, K., Hansen-Hagge, T. et Bartram, C. 1990. Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. *Nucleic Acids Research* **18**(4): 1079.
- Sedlik, C., Saron, M., Sarraseca, J., Casal, I. et Leclerc, C. 1997. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(14): 7503-8.
- Simpson, A. A., Chipman, P. R., Baker, T. S., Tijssen, P. et Rossmann, M. G. 1998. Structure of an Insect Parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Angstrom Resolution. *Structure* **6**(11): 1355-1367.
- Sugimoto, M., Esaki, N., Tanaka, H. et Soda, K. 1989. A simple and efficient method for the oligonucleotide-directed mutagenesis using plasmid DNA template and phosphorothioate-modified nucleotide. *Analytical Biochemistry* **179**(2): 309-11.
- Tattersall, P. et Bratton, J. 1983. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *Journal of Virology* **46**(3): 944-55.
- Thacker, T. C. et Johnson, F. B. 1998. Binding of bovine parvovirus to erythrocyte membrane sialylglycoproteins. *Journal of General Virology* **79**(Part 9): 2163-2169.
- Tijssen, P., Bergeron, J., Dubuc, R. et Hébert, B. 1995. Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Seminars in Virology* **6**(5): 319-328.

- Truyen, U. et Parrish, C. R. 1992. Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *Journal of Virology* **66** (9): 5399-408.
- Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W. *et al.* 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**(5000): 1456-64.
- Vandeyar, M. A., Weiner, M. P., Hutton, C. J. et Batt, C. A. 1988. A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants. *Gene* **65**(1): 129-33.
- Vashishtha, M., Phalen, T., Marquardt, M. T., Ryu, J. S., Ng, A. C. et Kielian, M. 1998. A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. *Journal of Cell Biology* **140**(1): 91-9.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V. et Vuento, M. 1998. Intracellular route of canine parvovirus entry. *Journal of Virology* **72**(1): 802-6.
- Wang, X. S., Yoder, M. C., Zhou, S. Z. et Srivastava, A. 1995. Parvovirus B19 promoter at map unit 6 confers autonomous replication competence and erythroid specificity to adeno-associated virus 2 in primary human hematopoietic progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(26): 12416-20.
- Weichert, W. S., Parker, J. S. L., Wahid, A. T. M., Chang, S. F., Meier, E. et Parrish, C. R. 1998. Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology* **250**(1): 106-117.
- Wu, H. et Rossmann, M. G. 1993. The canine parvovirus empty capsid structure. *Journal of Molecular Biology* **233**(2): 231-44.

ANNEXES

Annexe 1

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES (1993-1999)

B. Hébert and P. Tijssen (1999) Precise mapping of the allotropic determinant of porcine parvovirus. Manuscrit en préparation pour soumettre à *Journal of Virology*.

B. Hébert and P. Tijssen (1999) Gene 32 protein enhances efficiency of PCR/*Dpn* I-based modified site-directed mutagenesis methods. *BioTechniques* (Soumis pour publication)

P. Tijssen, M. Laakel, Z. Zádori, B. Hébert (1999) Parvoviruses of Rodents, Pigs, Cattle and Waterfowl. *In Encyclopedia of Virology*, 2nd Edition.

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

P. Tijssen, J. Bergeron, R. Dubuc and B. Hébert (1995). Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Seminars in Virology* 6(5):319-328

B. Hébert, J. Bergeron, E.F. Potworowski and P. Tijssen (1994). Protein tyrosine kinases transcribed in a murine thymic medullary epithelial cell line. *Gene* 143:257-260

B. Hébert, J. Bergeron, P. Tijssen and E.F. Potworowski (1993). Increased PCR sensitivity by using paraffin wax as a reaction mix overlay. *Molecular and Cellular Probes* 7:249-252

PROCEEDINGS

J. Campione-Piccardo, B. Hébert and P. Tijssen. (1994) Kinetics of quantitative polymerase chain reaction. *Clinical Chemistry* (1994) 40:656

CONFÉRENCES (1993-1999)

B. Hébert, A. Simpson, Z. Zádori, P. Tijssen and M.G. Rossmann. Towards a structure of porcine parvovirus: purification and crystallization of native and recombinant particles. American Society for Virology, 18th annual meeting, Amherst, USA (Juillet 1999)

B. Hébert, Z. Zádori et P. Tijssen. Les vaccins parvoviraux ont des différences minimales avec les souches pathogènes.

Journées de recherche et colloque en productions animales, Québec, Canada (Mai 1998)

V. Fortin, M.A. Régis, B. Hébert, Z. Zádori, P. Tijssen, D. Oth

L'évaluation *in vitro* de la production de TNF par des monocytes/macrophages de porc, en présence de parvovirus.

Journées de recherche et colloque en productions animales, Québec, Canada (Mai 1998)

B. Hébert, M. Letarte, A. Pickett and P. Tijssen. PCR detection of low-levels of porcine parvovirus: application for screening of therapeutic products.

«Seventh Parvovirus Workshop», Heidelberg, Allemagne (Septembre 1997)

B. Hébert, M. Laakel, Z. Zádori, S. Gariépy, M.-C. Lacoste and P. Tijssen. Relative importance of capsid residues associated with the *in vitro* tropism of porcine parvovirus during the initial steps of infection.

«Seventh Parvovirus Workshop», Heidelberg, Allemagne (Septembre 1997)

M. Laakel, B. Hébert, L. Babiuk and P. Tijssen. Porcine parvovirus tropism in novel, immortalized TV cell lines.

«Seventh Parvovirus Workshop», Heidelberg, Allemagne (Septembre 1997)

B. Hébert, R. Dubuc, J. Bergeron, G. Marsolais and P. Tijssen. Molecular basis of pathogenesis and tropism differences among porcine parvovirus strains.

International Pig Veterinary Society Meeting, Bologne, Italie (Juillet 1996)

B. Hébert, R. Dubuc, J. Bergeron and P. Tijssen. Porcine parvovirus tropism is governed by very few residues uniquely located on the capsid.

«Sixth Parvovirus Workshop», Montpellier, France (Septembre 1995)

B. Hébert, J. Bergeron, P. Tijssen and E.F. Potworowski. Novel protein tyrosine kinases of thymic epithelial cells.

37ième Congrès annuel de la CFBS, Montréal, Canada (Juin 1994)

J. Bergeron, B. Hébert and P. Tijssen. Sequence of porcine parvovirus Kresse and comparison of its allotropic determinant with that of NADL-2 and field isolates.

«Fifth Parvovirus Workshop», Crystal River, USA (Novembre 1993)