

Université du Québec  
INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

*Effets de mutations ponctuelles dans les régions  
conservées de la protéine de structure VP2 du virus B19*

Par  
CHAHRAZED BELABANI

Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade de maîtrise ès Sciences (M.Sc) en virologie  
Avril 07

Jury d'évaluation

Examineur externe	Dr Daniel Martineau Département de pathologie et microbiologie FMV, Université de Montréal
Examineur interne	Dr Patrick Labonté Centre INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche	Peter Tijssen Centre INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	Maximilien Arella Centre INRS-Institut Armand-Frappier

*À la mémoire de mon frère Chafik*

*À mes parents sans qui je ne serais  
pas où j'en suis aujourd'hui*

*À ma sœur Nabila qui a toujours su me  
faire sourire dans les moments difficiles*

*À toi Malek, lumière de ma vie*

## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement mon directeur de recherche le Dr Peter Tijssen pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et offert la chance de réaliser le présent travail.

Je remercie mon codirecteur le Dr Maximilien Arella pour m'avoir encouragée et fait confiance.

Je tiens à remercier le Dr Zoltan Zadori pour m'avoir permis de développer mon sens de l'autonomie et de l'initiative.

Je remercie sincèrement le Dr Mohamed El-far pour son amitié et ses précieux conseils.

J'adresse mes sincères remerciements à Sandra Fernandes pour m'avoir fait partager avec une grande générosité son expérience et ses connaissances. Son amitié, son écoute et ses conseils m'ont aidée dans bien des circonstances.

Je tiens à adresser toute ma reconnaissance au Dr Emmanuel Moreau pour son précieux support scientifique. J'ai apprécié tant sa compétence que sa gentillesse.

Je remercie chaleureusement Micheline Letarte et le Dr J Szelei pour leur disponibilité, leurs conseils et leur bonne humeur.

Je remercie tous les autres membres de l'équipe du laboratoire pour leur aide et leur sympathie.

Je remercie les membres de l'équipe de microscopie électronique et confocale pour leur accueil et leurs compétences.

Enfin, j'aimerais exprimer toute ma gratitude et mon amour pour mes chers parents, ma sœur Nabila et mon ange Malek. Leur confiance et leur amour m'ont toujours aidée à avancer et à me surpasser.

Je remercie tous mes amis d'ici, de France et d'Algérie pour leur réconfort et leur soutien.

Merci Kamel pour ta présence constante, ta patience et tes encouragements.

## SOMMAIRE

Les antiviraux les plus en développement sont, en général, spécifiques des enzymes virales. Cependant, le risque d'émergence de virus résistants à de telles molécules n'est pas à exclure. Par conséquent, des stratégies alternatives ciblant d'autres étapes du cycle viral, tel que l'assemblage de la capside devraient être entreprises. Une telle approche nécessiterait une meilleure connaissance du processus régissant la formation de la capside. Le parvovirus B19 est un petit virus non enveloppé contenant un seul brin d'ADN de 5,5 kb. Sa capside comprend les protéines structurales VP1 et VP2. L'expression de VP2 dans le système baculovirus aboutit à la production de capsides recombinantes (VLPs). Nous avons exploité cette caractéristique, afin d'étudier les effets de mutations dans les régions conservées et stratégiques de la VP2 sur son assemblage en capside. Ces mêmes résidus ont également été mutés dans le clone infectieux du B19, dans le but de vérifier les phénotypes engendrés dans des cellules de mammifère. Les capsides recombinantes ont également servi de matrice pour la production d'anticorps recombinants (scFv) anti-VLPs, en utilisant la technique de présentation par les phages.

Dans le système baculovirus, nous avons pu, à l'aide de différentes techniques, mettre en évidence l'expression de VP2, ainsi que l'effet bloquant des mutations sur la formation de la capside. Malheureusement, ce résultat n'a pas pu être vérifié dans les cellules de mammifère. Par ailleurs, la spécificité de l'unique scFv que nous avons obtenu, a également pu être vérifiée.



---

Étudiante

---

Directeur de recherche

## TABLES DES MATIÈRES

<i>Table des illustrations</i> .....	1
<i>Liste des abréviations</i> .....	3
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	7
<b>I. Historique</b> .....	8
<b>II. Taxonomie</b> .....	8
<b>III. Structure</b> .....	14
<b>III.1. Morphologie et propriétés physico-chimiques</b> .....	14
<b>III.2. Génome viral</b> .....	14
<b>III.3. Transcription virale</b> .....	15
<b>III.4. Protéines virales</b> .....	18
III.4.1. Les protéines non structurales .....	18
III.4.2. Les protéines structurales .....	19
<b>V. Tropisme cellulaire</b> .....	23
<b>V.1. Récepteur cellulaire</b> .....	26
<b>V.2. Infection des cellules permissives</b> .....	26
<b>V.3. Infection des cellules semi-permissives</b> .....	27
<b>V.4. Culture</b> .....	27
<b>VI. Physiopathologie</b> .....	27
<b>VII. Réponse immunitaire</b> .....	28
<b>VII.1. Réponse humorale</b> .....	28
<b>VII.2. Réponse cellulaire</b> .....	29
<b>VIII. Manifestations cliniques</b> .....	30
<b>VIII.1. Chez le sujet immunocompétent</b> .....	30
VIII.1.2. Arthropathie .....	31
<b>VIII.2. Chez la femme enceinte</b> .....	31
<b>VIII.3. Chez les patients souffrant de troubles hématologiques</b> .....	32
<b>VIII.4. Chez les sujets immunodéprimés</b> .....	32

VIII.5. <i>Manifestations cliniques rares</i> .....	33
VIII.6. <i>Persistence</i> .....	33
IX. <i>Épidémiologie et transmission</i> .....	36
IX.1. <i>Épidémiologie</i> .....	36
IX.2. <i>Transmission</i> .....	37
X. <i>Diagnostic</i> .....	38
X.1. <i>Méthodes de diagnostic direct</i> .....	38
X.2. <i>Méthodes de diagnostic indirect</i> .....	39
XI. <i>Traitement</i> .....	40
XII. <i>Variabilité génétique</i> .....	41
XIII. <i>La capside virale</i> .....	43
XIII.1. <i>Structure</i> .....	50
XIII.2. <i>Assemblage</i> .....	50
XIII.2.1. <i>Les intermédiaires structuraux et assemblage</i> .....	53
XIII.2.2. <i>Localisation cellulaire de l'assemblage</i> .....	54
XIII.3. <i>Capsides recombinantes (VLPs)</i> .....	57
XIII.4. <i>Acides aminés : importance, différence et conservation de séquences</i> .....	57
XIII.5. <i>Acides aminés mutés dans cette étude</i> .....	61
XIV. <i>Système baculovirus et particules recombinantes vides (VLPs)</i> .....	61
XIV.1. <i>Le système baculovirus</i> .....	61
XIV.2. <i>Les VLPs</i> .....	65
XV. <i>Le phage display</i> .....	67
XV.1. <i>Les phages filamenteux</i> .....	67
XV.2. <i>Les banques combinatoires d'anticorps</i> .....	72
XV.3. <i>Applications</i> .....	73
<i>Objectifs de cette étude</i> .....	75
<b>MÉTHODOLOGIE</b> .....	76
I. <i>Plasmides, lignées cellulaires et banques de phages</i> .....	77
I.1. <i>Les plasmides</i> .....	77
I.2. <i>Les lignées cellulaires</i> .....	77
I.3. <i>La banque de phages</i> .....	78
II. <i>Techniques de biologie moléculaire</i> .....	78



<b>II.1. Clonage du gène VP2 dans le vecteur pFastBac1 .....</b>	<b>78</b>
II.1.1. Amplification PCR.....	78
II.1.2. Digestion.....	81
II.1.3. Ligation.....	81
<b>II.2. Préparation des bactéries électrocompétentes.....</b>	<b>82</b>
<b>II.3. Sélection des clones positifs .....</b>	<b>82</b>
II.3.1. Transformation bactérienne .....	82
II.3.2. Purification de l'ADN plasmidique par « Mini-préparation » .....	82
II.3.3. Midi-préparation .....	83
<b>II.4. Purification de l'ADN.....</b>	<b>84</b>
II.4.1. Avec le Kit Miniprep Express Matrix .....	84
II.4.2. Avec le Kit Qiagen.....	84
<b>II.5. Création des mutations .....</b>	<b>85</b>
<b>II.6. Clonage du gène VP2 dans le clone infectieux.....</b>	<b>88</b>
II.6.1. Obtention des inserts .....	88
II.6.2. Digestion du clone infectieux .....	90
II.6.2. Digestion du clone infectieux .....	91
<b>III. Expression de VLPs dans le système baculovirus.....</b>	<b>91</b>
<b>III.1. Production des bacmides recombinants.....</b>	<b>91</b>
III.1.1. Transformation de bactéries DH10Bac .....	91
III.1.2. Extraction et purification du bacmide recombinant .....	94
<b>III.2. Production des baculovirus recombinants.....</b>	<b>97</b>
III.2.1. Transfection des cellules Sf9 .....	97
III.2.2. Amplification du stock viral .....	98
<b>III.3. Titrage des virus recombinants .....</b>	<b>98</b>
<b>III.4. Expression des protéines dans les cellules High-Five .....</b>	<b>99</b>
III.4.1. Vérification de l'expression de VP .....	99
III.4.2. Production de VP2 .....	99
<b>III.5. Purification des protéines à partir du surnageant .....</b>	<b>99</b>
<b>IV. Expression de VP2 dans les cellules de mammifère.....</b>	<b>100</b>
<b>IV.1. Transfection des cellules COS-7.....</b>	<b>100</b>
<b>V. Méthodes d'analyse des protéines.....</b>	<b>101</b>
<b>V.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS.....</b>	<b>101</b>
V.1.1. Préparations .....	101
V.1.2. Technique.....	101
<b>V.2. Coloration au bleu de coomassie .....</b>	<b>102</b>
<b>V.3. Immunobuvardage de type Western .....</b>	<b>102</b>
<b>V.3.1. Solutions .....</b>	<b>102</b>
V.3.2. Montage et transfert .....	102

V.3.3. Révélation des protéines .....	102
V.4. Microscopie électronique.....	103
V.5. Immunofluorescence .....	103
V.5.1. Cas des cellules Sf9.....	103
V.5.2. Cas des cellules Cos-7 .....	104
V.6. Microscopie confocale.....	104
VI. Production d'anticorps recombinants par phage display.....	104
VI.1. Croissance de la banque .....	105
VI.2. Première sélection .....	105
VI.3. Préparation des phages .....	106
VI.4. Production de scFvs solubles.....	107
VI.5. Vérification de la spécificité et des applications des scFvs.....	108
VI.5.1. ELISA.....	108
VI.5.2. Immunobuvardage de type Western .....	108
VI.5.3. Immunofluorescence .....	109
<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>110</b>
<b>I. Expression de capsides recombinantes (VLPs) composées de la protéine VP2 mutée et sauvage dans le système baculovirus.....</b>	<b>111</b>
I.1. Obtention de l'insert .....	111
I.2. Clonage dans le vecteur pFastBac1 .....	111
I.3. Obtention des mutants .....	111
I.4. Obtention des Bacmides recombinants .....	114
I.5. Transfection des cellules Sf9.....	114
I.6. Vérification de l'expression de VP2.....	114
I.6.1. Par immunobuvardage de type Western .....	114
I.7. Amplification des baculovirus et titrage des stocks viraux .....	117
I.8. Expression des VP2 dans les cellules High Five .....	117
I.9. Précipitation des VLPs au sulfate d'ammonium .....	117
I.9.1. Vérification de la présence de VP2.....	119
I.9.1. Vérification de la présence de VP2.....	120
I.9.2. Vérification de l'expression des VLPs par microscopie .....	120
électronique .....	120
I.10. Localisation cellulaire de la protéine VP2.....	120
<b>II. Expression de capsides composées de la protéine VP2 mutée ou non dans les cellules de mammifère.....</b>	<b>120</b>

<i>II.1. Construction des clones .....</i>	<i>120</i>
<i>II.2. Localisation cellulaire de VP2 par microscopie confocale.....</i>	<i>127</i>
<i>III. Production d'anticorps recombinants anti-VLP par phage display.....</i>	<i>127</i>
 <i>DISCUSSION.....</i>	 <i>135</i>
<i>I. Expression des capsides recombinantes composées de la protéine VP2 sauvage ou mutée dans le système baculovirus .....</i>	<i>136</i>
<i>II. Expression VP2 mutée ou non dans les cellules de mammifères.....</i>	<i>140</i>
<i>III. Production d'anticorps recombinants scFv dirigée contre les capsides recombinantes du B19 par la technique du phage display.....</i>	<i>142</i>
 <i>Conclusion.....</i>	 <i>143</i>
 <i>Références bibliographiques.....</i>	 <i>145</i>

## Table des illustrations

### Figures :

<i>Figure 1 : Particules de parvovirus B19 analysées en microscopie électronique. ....</i>	9
<i>Figure 2 : Classification des Parvoviridae. ....</i>	11
<i>Figure 3 : Carte de transcription du B19V décrite par Ozawa et al. en 1987 et complétée par Luo et Astell en 1993. ....</i>	16
<i>Figure 4 : Cycle viral du B19V décrit par Young en 1996. ....</i>	21
<i>Figure 5 : Modèle de répllication du génome du B19V. ....</i>	24
<i>Figure 6 : Représentation schématique d'une capsidie icosaédrique (modifié de l'article Reguera et al. 2004). ....</i>	44
<i>Figure 7 : Représentation de l'association des sous-unités VP2 de la capsidie du B19V. ....</i>	46
<i>Figure 8 : Structures de parvovirus à faible résolution. ....</i>	48
<i>Figure 9 : Cryomicroscopie électronique de la capsidie du B19V. ....</i>	51
<i>Figure 10 : Rôle des signaux de transport nucléaire. ....</i>	55
<i>Figure 11 : Stabilité des acides aminés de la capsidie. ....</i>	59
<i>Figure 12 : Positions des acides aminés mutés. ....</i>	62
<i>Figure 13 : Représentation du processus de sélection de fragments d'anticorps par la technique du "phage display". ....</i>	68
<i>Figure 14 : Structure du bactériophage M13. ....</i>	70
<i>Figure 15 : Représentation de la transposition du gène d'intérêt (VP2) du vecteur pFastBac1 dans le bacmide du baculovirus, à l'aide du vecteur auxiliaire. ....</i>	95
<i>Figure 16 : Digestions avec les enzymes EcoRI et SphI effectuées sur le vecteur pFastBac1 et PCR réalisée sur le clone infectieux B194244Δ (gel d'agarose 1%).....</i>	112
<i>Figure 17 : Immunobuvardage de type Western sur des culots de cellules High Five infectées (anticorps anti-B19 R92F6). ....</i>	115
<i>Figure 18 : Immunofluorescence sur des cellules High Five infectées (anticorps anti-B19 R92F6). ....</i>	118
<i>Figure 19 : Immunobuvardage de type Western sur les fractions résultant de la précipitation des capsidies recombinantes au sulfate d'ammonium à partir des surnageants de cellules High Five infectées (anticorps anti-B19 R92F6). ....</i>	121
<i>Figure 20 : Microscopie électronique sur les fractions résultant de la précipitation des capsidies recombinantes au sulfate d'ammonium à partir des surnageants de cellules High Five infectées. ....</i>	123
<i>Figure 21 : Images obtenues en microscopie confocale de cellules High Five infectées avec les baculovirus recombinants. ....</i>	125
<i>Figure 22 : Image obtenue en microscopie confocale de cellules Cos-7 transfectées avec le clone infectieux de type sauvage. ....</i>	128
<i>Figure 23 : Cinétique de fixation du scFv produit aux capsidies recombinantes VP2 précipitées au sulfate d'ammonium, déterminée par ELISA . ....</i>	130
<i>Figure 24 : Immunobuvardage de type Western avec le scFv produit sur les particules recombinantes VP2 précipitées au sulfate d'ammonium. ....</i>	133

**Tableaux :**

**Tableau 1 :** Principales manifestations cliniques liées à une infection par le B19V. .... 34

**Tableau 2 :** Séquences des oligonucléotides ayant servies à l'amplification du gène VP2 et son séquençage, une fois cloné dans le vecteur pFastBac1..... 79

**Tableau 3 :** Séquences des oligonucléotides utilisés pour la création des mutations dans le vecteur recombinant pFastBac1/VP2. .... 86

**Tableau 4 :** Séquences des oligonucléotides utilisés pour la vérification de la présence des mutations dans les vecteurs recombinants pFastBac1/VP2. .... 89

**Tableau 5 :** Séquences des oligonucléotides utilisés pour la vérification de la présence des mutations dans les vecteurs recombinants B19/VP2..... 92

## Liste des abréviations

aa	: Acide aminé
AAV	: Virus Adeno-associé
Ag	: Antigène
BFU-E	: “Bust Forming Units of Erythroid cells”
CFU-E	: “Colony Forming Units of Erythroid cells”
CPV	: Canine parvovirus
ELISA	: “Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay”
FPV	: Feline leucopenia parvovirus
GmDNV	: <i>Galleria mellonella</i> Densosovirus
Ig	: immunoglobuline
IL	: Interleukine
ITR	: “Inverted terminal repeat”
MOI	: « Multiplicity of infection » Multiplicité d’infection
MVM	: Minute virus of mice
NLM	: « Nuclear localisation Motif » (motif de localisation nucléaire)
NLS	: « Nuclear localisation Signal » (signal de localisation nucléaire)
NS	: Protéine non structurale
ORFs	: « Open Reading Frame » (cadre de lecture ouvert)
PCR	: « Polymerase Chain Reaction »
PPV	: Porcine parvovirus
scFv	: « Single chain Fv » (fragment variable simple-chaîne)
VLPs	: Virus-Like Particules (capsides recombinantes vides)
VP	: « Viral protein » (protéine de capside)
VP1u	: Région unique de VP1

## ***INTRODUCTION***

Les capsides virales permettent à la fois la protection du matériel génétique du virus, et aussi son transfert à la cellule hôte pour amorcer un nouveau cycle infectieux. Il est donc pertinent de s'intéresser aux stratégies d'assemblage de ces structures, afin de mieux les cerner et de définir les régions impliquées dans le processus en question. En effet, celles-ci représentent des cibles potentielles pour le développement d'agents qui bloqueraient la formation de la capside et donc qui mettraient un terme à la multiplication du virus.

Le virus B19, unique parvovirus pathogène chez l'humain, est impliqué dans diverses manifestations cliniques dont les principales sont : le mégalérythème, des arthralgies, des désordres hématologiques (crise aplasique et d'anémie chronique chez les immunodéprimés), ainsi que des atteintes fœtales durant la grossesse. Bien que la structure à symétrie icosaédrique  $T=1$  du virus, ainsi que les résultats de plusieurs études réalisées sur d'autres parvovirus, s'accordent avec la possibilité de l'implication d'intermédiaires structuraux, sous forme de dimères, trimères ou pentamères, dans l'assemblage de la capside virale, cette étape du cycle viral demeure inexplorée dans le cas du B19. En effet, son érythrotropisme, ainsi que l'absence de systèmes cellulaires permettant sa culture, ont fait obstacle à l'avancée des recherches portant sur le virus. Cependant, l'expression de la composante majoritaire (95%) de la capside, la protéine VP2, dans le système baculovirus aboutit à la production de capsides recombinantes (VLPs) et démontre que la formation de capsides ne nécessite pas des protéines d'échafaudage, ce qui vient alléger en partie les contraintes citées ci-dessus. De plus, le clone infectieux B19, mis au point dans notre laboratoire, est également à ajouter aux outils permettant l'étude du virus.

Dans la première partie de ce projet de maîtrise, ces deux derniers éléments sont employés dans le but de savoir si la mutation de quatre résidus de VP2, qui sont non seulement conservés à travers les parvovirus, mais occupent, en plus, des positions stratégiques dépendamment de l'état multimérique de la protéine, engendre ou non un effet sur l'assemblage de la capside virale. L'étude est entreprise aussi bien dans des



cellules d'insectes, en utilisant le système baculovirus, que dans des cellules de mammifère au moyen du clone infectieux.

Bien qu'il n'existe pas de traitement contre l'infection à virus B19, l'administration d'immunoglobulines dans le cas d'une infection persistante, s'est cependant révélée efficace et souvent curative (Kurtzman et al., 1989; Frickhofen et al., 1990), mais malheureusement onéreuse. L'utilisation d'anticorps recombinants produits par la technique du phage display, un moyen moins laborieux et moins coûteux, pourrait remplacer celle des immunoglobulines. De plus, ces anticorps pourraient constituer de nouveaux réactifs en recherche.

Dans la seconde partie du projet, nous avons justement saisi l'opportunité de disposer de VLPs purifiées pour les utiliser comme cible en vue de produire, par la technique de présentation par les phages, des anticorps recombinants (scFv) qui leur seraient spécifiques.

## ***DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES***

## I. Historique

Le virus B19 a été découvert tout à fait fortuitement (Cossart et al., 1975). En effet, en 1975, lors du dépistage de l'antigène HBs du virus de l'hépatite B (VHB) dans le sérum de donneurs de sang, Yvonne Cossart, une virologue Australienne, a observé des réactions faussement positives pour un sérum. Ce dernier occupait la position 19 dans la rangée B, d'où le nom du virus. L'examen en microscopie électronique révélait les particules représentées dans la *figure 1*. La morphologie et les dimensions évoquaient bien celles d'un parvovirus. L'appartenance à la famille des *Parvoviridae* fut définitive après analyse du génome viral.

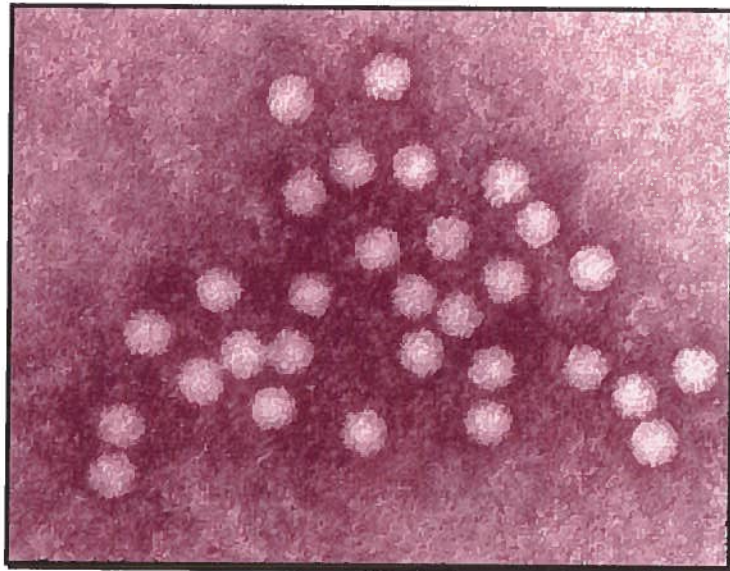
Aucun pouvoir pathogène n'a été associé à ce nouveau virus, jusqu'à l'observation en 1981 d'un lien avec des crises d'érythroblastopénie chez des patients souffrant d'anémie hémolytique chronique (Pattison et al., 1981). Deux ans plus tard, lors d'une épidémie de mégalérythème épidémique ou cinquième maladie de l'enfant, dans deux écoles londoniennes, le virus B19 est reconnu comme agent étiologique de cette maladie (Anderson et al., 1983). Peu de temps après, d'autres pathologies se sont ajoutées à la liste, tels que l'anasarque foeto-placentaire (Brown et al., 1984); l'arthrite chez les adultes (Reid et al., 1985, White et al., 1985) et enfin, l'anémie chronique chez les sujets immunodéficients (Koch et al., 1990).

Initialement nommé «SPLV» (Serum Parvovirus-Like-Virus), HPV (Human Parvovirus), puis parvovirus B19, ce virus est à présent appelé Virus B19 (B19V) selon le 7<sup>ème</sup> rapport international de taxonomie des virus (Van Regenmortel et al., 2000).

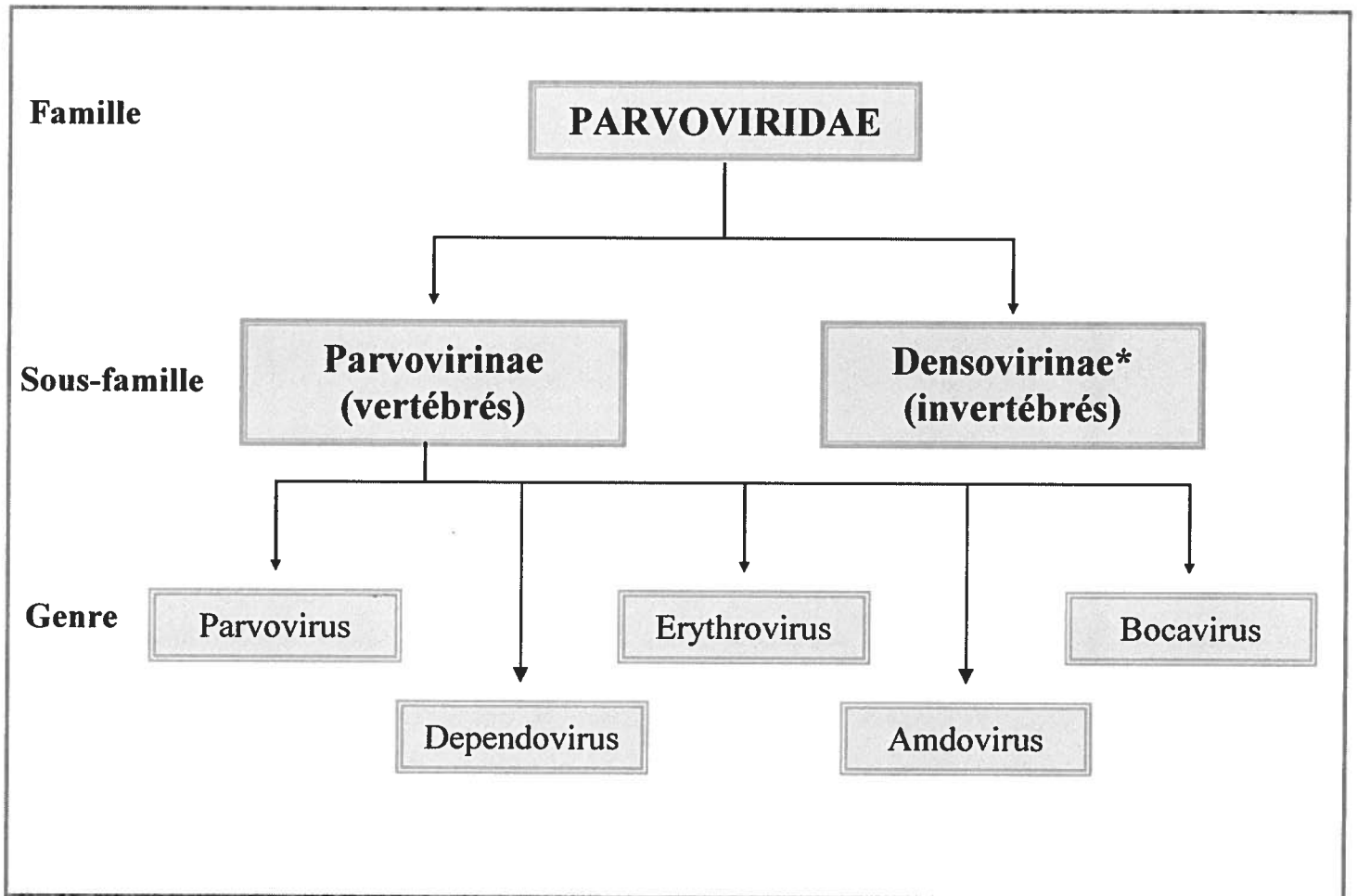
## II. Taxonomie

La grande famille des *Parvoviridae* réunit des petits virus nus à ADN simple-brin. Selon que ses membres infectent les vertébrés ou les invertébrés, cette famille se divise en *Parvovirinae* et *Densovirinae*, respectivement (Van Regenmortel et al., 2000) (*figure 2*).

*Figure 1* : Particules de parvovirus B19 analysées en microscopie électronique.



***Figure 2 : Classification des Parvoviridae.***



\* La sous-famille des Densovirinae comprend les genres suivants : *Densovirus*, *Iteravirus*, *Brevidensovirus* et *Pefudensovirus*.

Dans la sous-famille des Densovirinae, on retrouve les genres *Densovirus*, *Iteravirus*, *Brevidensovirus* et *Pefudensovirus*. Ces derniers étant des virus d'invertébrés, ils ne seront pas décrits dans ce mémoire

Les Parvovirinae sont subdivisés en cinq genres (Fauquet et al., 2005) :

- Le genre *Dependovirus* regroupe des virus défectifs (adeno-associated-virus 1 à 8 : AAV) dont la répllication est dépendante d'un virus auxiliaire de type adénovirus ou herpesvirus. En l'absence de celui-ci, le génome viral s'intègre au génome cellulaire. À date, aucune pathologie humaine n'a été associée à ces virus. Bien au contraire, ils seraient anti-oncogéniques (Hermonat, 1989).
- Le genre *parvovirus* rassemble des virus autonomes, pathogènes pour de nombreux vertébrés, tels que le MVM (*Minute virus of mice*), PPV (*Porcine parvovirus*), CPV (*Canine parvovirus*), FPV (*Feline Panleucopenia parvovirus*).
- Le genre *Erythrovirus* renferme en plus du virus B19, les espèces SPV (*Simian Parvovirus*), PmPV (*Pig-tailed macaque parvovirus*) et RmPV (*Rhesus macaque parvovirus*). Cependant, l'intégration des deux espèces BPV-3 (*Bovine virus type3*) et ChPV (*Chipmunk Parvovirus*) est actuellement à l'étude (Fauquet et al., 2005). Très récemment, un nouveau parvovirus humain (PARV4) a été identifié dans un pool de plasma destiné à l'industrie de dérivés sanguins (Fryer et al., 2006).
- Le genre *Amdovirus* dont l'unique espèce est l'AMDV (*Aleutian mink disease virus*).
- Et enfin, le genre *Bocavirus* compte les espèces BPV (*Bovine parvovirus*) et CnMV (*Canine minute virus*).



### III. Structure

#### *III.1. Morphologie et propriétés physico-chimiques*

Le B19V est un virus non enveloppé, icosaédrique, d'environ 20 à 25 nm (Cossart et al., 1975). La capside est composée de deux protéines : VP1 et VP2 (Cotmore et al., 1986). Elle renferme, avec la même fréquence, une molécule d'ADN simple-brin de polarité positive ou négative (Siegl et al., 1985).

Le masse moléculaire de la particule virale est de  $5.6 \times 10^6$  Da (Heegaard et Brown, 2002) et sa densité de 1.39 à 1.42 g/cm<sup>3</sup> en gradient de chlorure de césium. Cette forte densité est due au rapport protéines/ADN relativement élevé (20% d'ADN contre 80% de protéines).

La teneur limitée en ADN, ainsi que l'absence d'enveloppe rendent le B19V, de même que les autres parvovirus, extrêmement résistants à l'inactivation physique. Le virus est stable à 56°C pendant une heure et aux pH de 3 à 9. Par ailleurs, ces virus ne présentent aucune sensibilité aux solvants organiques (Schwarz et al., 1992). Toutefois, une inactivation peut être réalisée par traitement au formol, au  $\beta$ -propiolactone et aux rayonnements gamma (Heegaard et Brown, 2002).

La structure de particules recombinantes vides du B19V a récemment été déterminée par cristallographie aux rayons X, à une résolution de 3.5 Å (Kaufmann, et al., 2004).

#### *III.2. Génome viral*

Le génome du B19 est constitué d'un brin linéaire d'ADN monocaténaire de 5.6 kb (Clewley, 1984). L'analyse de la séquence du clone infectieux B19 a démontré que les séquences inversées répétées (ITR) sont de 383 nucléotides chacun, dont 365 forment des structures en épingles à cheveux (Deiss et al., 1990).

### *III.3. Transcription virale*

La *figure 3* rapporte le profil de transcription du B19V (Ozawa et al., 1987 ; Luo et al., 1993).

L'initiation de la transcription virale a lieu à partir d'un seul promoteur, P6, situé en 5' à six unités de carte génomique (Doerig et al., 1987). Une séquence au centre du génome localisée à 44 unités de carte génomique renfermant juste une boîte TATA, pourrait constituer un second promoteur. Cependant, il n'a pas été montré que ce dernier est fonctionnel (Doerig et al., 1987).

Il est considéré que le promoteur P6 comprend toute l'extrémité 5', incluant la partie en épingle à cheveux. La boîte TATA est située en position 319 d'après la séquence de la souche de référence Pvbaua (Shade et al., 1986) et l'initiation de la transcription s'effectue 31 à 32 nucléotides en aval de ce motif (Blundell et al., 1987).

L'activité du promoteur P6 est régulée, en partie, par la fixation de divers facteurs cellulaires. En effet, quatre boîtes GC capables de fixer le facteur Sp1, ainsi que trois sites présentant une forte affinité pour le facteur YY1, ont été mis en évidence (Brundell et Astell., 1989 ; Momoeda et al., 1994a ; Raab et al., 2001). D'autres facteurs spécifiques des cellules érythroïdes (GATA, MZF) ou des cellules lymphoïdes (Octamer, c-Ets) seraient également capables de se fixer au promoteur (Raab et al., 2001 ; Vassias et al., 1998 ).

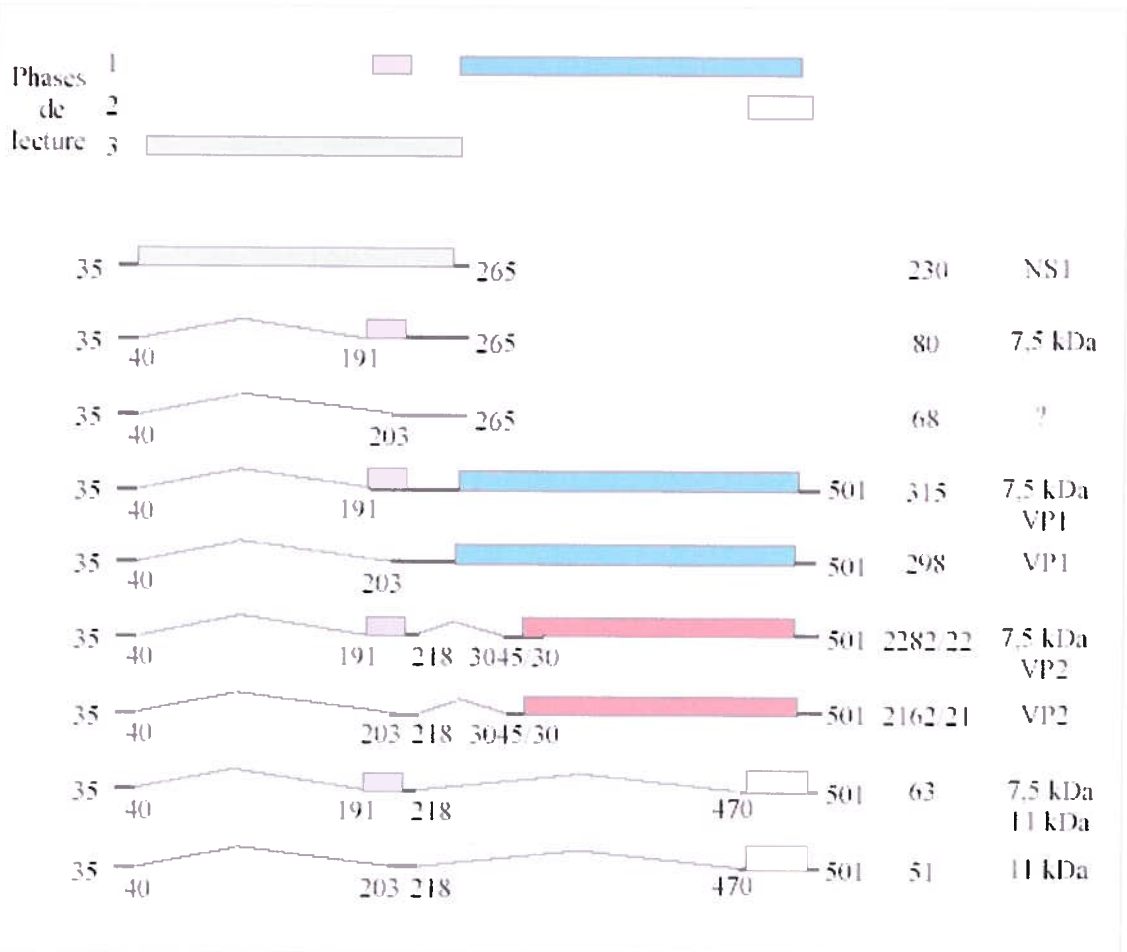
La transcription du B19V se fait sur plusieurs cadres de lectures ouverts (ORFs) répartis en trois phases (Ozawa et al., 1987 ; Luo et al., 1993). La portion gauche du génome code pour la protéine non-structurale NS1, la portion droite pour les deux protéines de structure VP1 et VP2 (Ozawa et al., 1987 ; Luo et al., 1993).

**Figure 3** : Carte de transcription du B19V décrite par Ozawa et al. en 1987 et complétée par Luo et Astell en 1993.

Les rectangles de couleur correspondent aux séquences codant pour les protéines virales indiquées à droite de la figure et les traits plus épais indiquent les séquences non traduites.

Il existe 3 phases de lecture composées de plusieurs cadres ouverts de lecture.

La 1ère phase contient les ORFs codant les protéines de 7,5 kDa, VP1 et VP2, la seconde, l'ORF codant la protéine de 11 kDa et la troisième, l'ORF codant la protéine NS1.



Au moins neuf transcrits différents sont produits. Tous ont en commun la séquence *leader* non traduite, au niveau de leur extrémité 5'. Par ailleurs, à l'exception du transcrit codant la protéine NS1, tous les ARNm sont épissés.

Le cadre de lecture en 5' est transcrit en un ARNm de 2.3 kb qui assure la synthèse de la protéine NS1 de 671 acides aminés (aa) (Cotmore et al., 1986).

Les deux ARNm résultant de la transcription par épissage alternatif du cadre ouvert de lecture située en 3' du génome, codent pour les deux protéines structurales VP1 et VP2 (Cotmore et al., 1986).

Des petits ARNm sont également produits par le B19V. Ils sont classés en deux catégories. L'une renfermant des ARN de 687 et 807 nucléotides auxquels aucune fonction n'a été attribuée ; l'autre regroupant des ARN de 518 et 638 nucléotides qui codent pour une protéine de 11 Kd dont le rôle reste à définir (St-Amand et Astell, 1993). Une autre protéine de 7.5 Kd, également de fonction inconnue, pourrait être issue de différents messagers (Luo et Astell, 1993).

### ***III.4. Protéines virales***

#### ***III.4.1. Les protéines non structurales***

La protéine NS1 est la protéine non structurale majeure du B19V. Elle est composée de 671 acides aminés (77 kDa) et peut être phosphorylée sur ses résidus sérine et thréonine (Astell et al., 1997). De plus, l'analyse de la séquence peptidique de cette protéine met en évidence un signal de localisation nucléaire et montre des homologies avec les protéines non structurales des autres *Parvovirinae*.

NS1 agirait lors de la réplication virale en exerçant une activité d'endonucléase et d'hélicase (Morinet et al., 2000). Elle est également capable de transactiver son propre promoteur (Doerig et al., 1990), directement en se liant à l'ADN ou indirectement en interagissant avec des facteurs cellulaires (Raab et al., 2002).

Les fonctions de NS1 demeurent difficiles à mettre en évidence du fait de sa cytotoxicité *in vitro* (Ozawa et al., 1988 ; Pillet and Morinet, 2002). Cette toxicité serait associée à la présence d'un domaine de liaison aux nucléosides triphosphates, composé de deux sites (Momoeda et al., 1994b). Le mécanisme impliqué dans la cytotoxicité de NS1 ferait intervenir un processus apoptotique selon deux voies : la voie des caspases (Moffatt et al., 1998) et la voie du TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor) (Sol et al., 1999).

Deux autres petites protéines virales de 7.5 et 11 kDa identifiées dans les cellules infectées sont également comptées parmi les protéines non structurales (Luo et Astell, 1993 ; St-Amand et Astell, 1993). La fonction de ces deux protéines est encore inconnue.

#### *III.4.2. Les protéines structurales*

Deux protéines composent la capsid du B19V : VP1 de 84 kd et 781 acides aminés et VP2 de 58 kd et 554 acides aminés. VP1 diffère de VP2 par les 227 acides aminés supplémentaires à son extrémité N-terminale.

L'expression de ces protéines dans le système baculovirus montre qu'elles sont capables de s'autoassembler pour former des particules recombinantes vides (VLPs) présentant les mêmes caractéristiques morphologiques et antigéniques que le virus natif (Brown et al., 1991 ; Kajigaya et al., 1991). Des particules constituées de VP2 seule, de morphologie normale, peuvent également être obtenues dans ce système, indiquant que VP1 est facultative pour l'assemblage (Kajigaya et al., 1991) au même titre que les 25 premiers acides aminés de VP2 (Kawase et al., 1995). Au contraire, la protéine VP1 exprimée seule n'est pas en mesure de former des VLPs (Kajigaya et al., 1991 ; Wong et al., 1994). Cet outil d'expression de particules recombinantes a non seulement servi au développement des tests sérologiques commerciaux actuellement utilisés (Young et Brown, 2004), mais a aussi largement contribué à comprendre plusieurs aspects liés aux protéines de la capsid du B19V, en l'occurrence :

- L'analyse de la structure tridimensionnelle de la capsid virale qui a permis, entre autre, de mettre en évidence des différences structurales avec les autres parvovirus (cf Chapitre XIII) (Agbandje et al., 1994 ; Kauffman et al., 2004);
- La localisation d'épitopes impliqués dans la neutralisation du virus. Ces derniers sont présents au niveau des deux protéines de structure. Les épitopes localisés dans la région unique de VP1 (VP1u) sont majoritairement linéaires (Saikawa et al., 1993) et exposés à la surface de la capsid (Rosenfeld et al., 1994), alors que ceux de la VP2 sont conformationnels (Sato et al., 1991) et se trouvent à l'extrémité C-terminale de la protéine (Kauffman et al., 2004).
- La détermination du site d'attachement au récepteur cellulaire l'antigène P. Il serait situé dans une région commune à VP1 et VP2 entre les acides aminés 577 et 677 (Brown, Anderson et Young, 1993).
- La mise en évidence d'une activité phospholipase A2. L'existence d'un site d'activité phospholipase A2 fonctionnel situé en C-terminal de VP1u (entre les acides aminés 130 et 190), a été démontrée dans notre laboratoire (Zadori et al., 2001). Cette activité serait impliquée dans le processus de l'entrée du virus par l'intermédiaire d'un co-récepteur, et celui de sa sortie par activation d'une voie sécrétoire faisant intervenir l'interleukine 6 (IL6) (Dorsch et al., 2002) dont la sécrétion est stimulée par la protéine non structurale NS1 (Moffatt et al., 1996). La présence de cette activité pourrait être associée à la pathogénie du B19V (Dorsch et al., 2002 ; Lehmann et al., 2003).

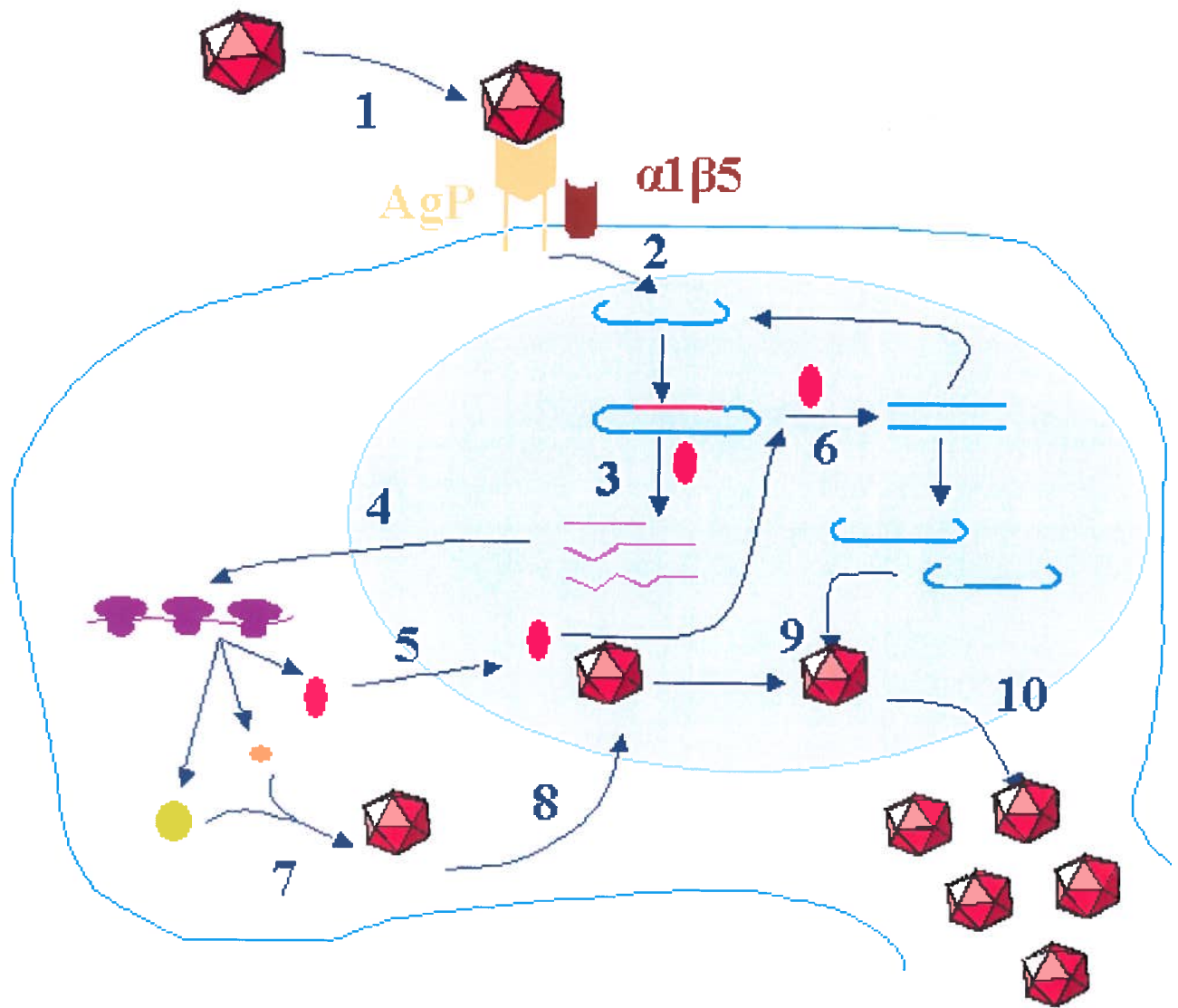
#### IV. Cycle de réplication viral

Les différentes étapes du cycle infectieux du B19V sont représentées dans la *figure 4* (Heegaard et Brown, 2002; Young, 1996). Le virus pénètre dans la cellule par endocytose, par l'intermédiaire de son récepteur : l'antigène P (Brown et al.

**Figure 4 :** Cycle viral du B19V décrit par Young en 1996.

- (1) Le virus se fixe sur son récepteur l'Ag P
- (2) Il pénètre dans la cellule par endocytose (participation éventuelle d'un co-récepteur  $\alpha 1\beta 5$ ), puis migre jusqu'au noyau où il est décapsidé, l'ADN simple brin est converti en ADN double brin par l'ADN polymérase cellulaire
- (3) Il y a ensuite transcription du génome viral par l'ARN polymérase eucaryote
- (4) Les ARNm sont traduits dans le cytoplasme aboutissant à la synthèse des protéines virales
- (5) La protéine NS1 va dans le noyau où elle régule la transcription et la réplication
- (6) L'ADN double brin se réplique pour aboutir à des formes simples brins
- (7) Dans le cytoplasme, les protéines de capsid VP1 et VP2 se préassemblent
- (8) Les procapsides intermédiaires migrent vers le noyau et terminent leur assemblage
- (9) Il y a encapsidation des génomes viraux
- (10) Libération des virions néoformés par lyse cellulaire





, 1993), avec l'éventuelle participation d'un co-récepteur  $\alpha\beta 5$  (Weigel-Kelley et al., 2001). L'ADN est décapsidé dans le noyau puis la réplication commence. Celle-ci nécessite que la cellule soit en phase S du cycle cellulaire, puisque le B19V requiert l'ADN polymérase cellulaire pour la conversion de son génome en une forme double brin covalente. C'est l'extrémité 3' repliée qui sert d'amorce dans ce processus. L'ARN polymérase cellulaire peut alors se fixer et initier la transcription. Les ARNm sont transportés dans le cytoplasme et les protéines virales synthétisées. La protéine NS1 est transportée dans le noyau où d'une part elle transactive le promoteur P6 (Doerig et al., 1990) et d'autre part participe à la réplication en exerçant une activité d'endonucléase et d'hélicase (Pillet et Morinette, 2002). Les formes répliquatives obtenues vont être soit utilisées comme matrice pour initier un nouveau cycle répliquatif, soit encapsidées (un brin d'ADN de polarité positive ou négative aléatoirement par capsid) dans les néocapsides formées par les protéines VP1 et VP2 après leur translocation du cytoplasme vers le noyau. Les néovirions sont libérés après 72 heures par lyse cellulaire.

La réplication du génome du B19V est mal connue. Cependant, du fait de la similarité de sa structure génomique avec celle des AAV (Berns, 1990), le modèle représenté dans la *figure 5* correspond à celui décrit pour ces derniers. L'extrémité 3' forme une amorce suite à son auto-hybridation et l'élongation de l'ADN débute. La forme répliquative double-brin qui en résulte subit une coupure sur le brin parental. Il s'agit de l'activité endonucléasique de NS1.

## **V. Tropisme cellulaire**

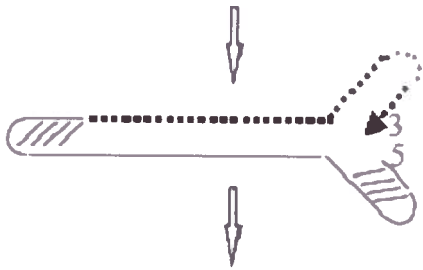
Les cellules-cibles du B19V sont les précurseurs de la lignée érythroïde de type BFU-E (burst forming units of erythroid cells) et CFU-E (colony forming units of erythroid cells) (Mortimer et al., 1983 ; Young, Moore, and Humphries, 1984). En effet, *in vitro*, la réplication du virus inhibe fortement la formation de colonies issues des progéniteurs érythroblastiques. Bien que ce tropisme particulier soit établi et qu'il explique que le virus est responsable d'épisodes d'érythroblastopénie transitoire (Brown et al., 1993), il demeure néanmoins mal connu *in vivo*. La détection du génome du B19V

**Figure 5** : Modèle de répllication du génome du B19V.

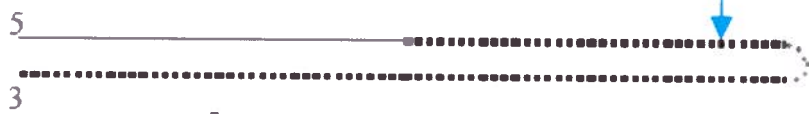
- A** Elongation de l'ADN simple brin par l'ADN polymérase eucaryote grâce à l'autohybridation de l'extrémité 3', synthèse de la forme répllicative double brin monomérique
- B** Ouverture de la forme répllicative et duplication aboutissant à une molécule d'ADN double brin dimérique
- C, D** Coupures de la molécule double brin conduisant à des formes monomériques servant de matrices pour la synthèse de simples brins positifs ou négatifs qui seront encapsidés dans les particules virales
- B, D** Le passage par la forme répllicative dimérique semble être facultatif, les molécules doubles brins pouvant être obtenues par coupure de la forme répllicative double brin monomérique



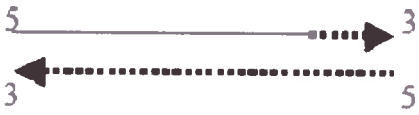
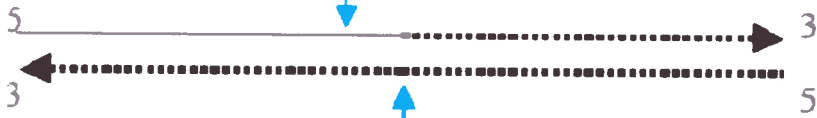
A



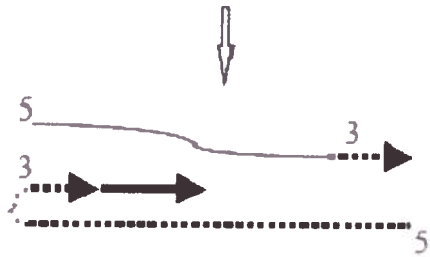
B



C



D



par PCR est positive dans d'autres tissus, telles que le tissu synovial (Zakrzewska et al., 2001), la moelle osseuse (Srivastava et Lu, 1988) et le foie (Eis-Hubinger et al., 2001). Cependant, il est difficile de montrer par une telle technique si l'ADN viral détecté n'est pas lié à une contamination par le sang périphérique.

### ***V.1. Récepteur cellulaire***

L'antigène érythrocytaire P, un glycosphingolipide neutre également nommé globoside, est le récepteur du B19V. Les individus dépourvus du phénotype p (1/200.000) sont résistants à l'infection (Brown et al., 1994). L'Ag P est largement exprimé à la surface des précurseurs érythroïdes, ce qui s'accorde avec le tropisme du virus pour ces cellules (Brown et al., 1993). Cependant, cette donnée seule est insuffisante pour expliquer ce phénomène. En effet, le globoside est également présent sur différents types cellulaires tels que les mégacaryocytes, les granulocytes, les cellules endothéliales, les cellules synoviales et les myocytes fœtaux (Rouger et al., 1987; Cooling et al., 1995). Aucun de ces types cellulaires ne s'est, néanmoins, révélé permissif à la réplication du virus, bien que théoriquement, ce dernier est supposé pouvoir pénétrer dans toutes ces cellules.

Ce tropisme extrêmement restreint pourrait être inhérent à divers paramètres : l'intervention de facteurs cellulaires propres aux BFU-E et CFU-E (Ozawa et al. 1987; Gallinella et al. 2000); l'absence de l'expression des transcrits correspondant aux protéines de capsid dans les cellules non permissives et enfin la présence de co-récepteurs cellulaires potentiels, ce dernier facteur étant appuyé par le fait que le taux d'expression de l'Ag P ne corrèle pas avec l'efficacité de la liaison du virus (Weigel-Kelley et al, 2001). Récemment, il a été démontré que l'activation d'une intégrine de type  $\alpha 1\beta 5$  était requise pour l'entrée du virus (Weigel-Kelley et al, 2003).

### ***V.2. Infection des cellules permissives***

Par définition, dans les cellules permissives, le virus accomplit un cycle complet aboutissant à la lyse de la cellule avec libération de néovirions.

Les BFU-E et les CFU-E sont les principales cellules permettant la réplication du B19V. Une nette diminution du nombre de ces cellules corrèle avec l'augmentation de la production virale (Takahashi et al., 1990). Toutefois, une transcription préférentielle des gènes codant pour les protéines de capsides a lieu (Ozawa et al., 1987). Par ailleurs, la susceptibilité des cellules BFU-E et CFU-E au virus augmente *in vitro* avec la différenciation cellulaire sous la dépendance de l'érythropoïétine (Takahashi et al., 1990).

### ***V.3. Infection des cellules semi-permissives***

La semi-permissivité de cellules signifie que si la pénétration du virus est possible, ni réplication virale, ni libération de néovirions ne se produisent (Liu et al. 1992). Par conséquent, toutes les cellules exprimant l'AgP sont potentiellement semi-permissives. Des études ont montré qu'à l'inverse du modèle permissif, dans les cellules semi-permissives, la synthèse d'ARNm spécifiques de la protéine NS1 est prédominante comparée à celle des protéines de structure VP1 et VP2 (Srivastava et al., 1990; Miki et Chantler, 1992). De plus, seule NS1 y est synthétisée, aboutissant à la mort des cellules par apoptose (Moffatt et al., 1998 ; Sol et al., 1999). Ceci suggère que les protéines de capside seraient indispensables à la réplication virale.

### ***V.4. Culture***

Les études sur le B19V ont été fortement entravées par l'absence d'un modèle animal et la difficulté de cultiver le virus du fait de son érythro-tropisme excessif. En effet, la propagation du B19V n'a pu être obtenue *in vitro* que dans des cellules primaires provenant de moelle osseuse humaine (Young et al., 1984), du foie fœtal (Yaegashi et al., 1989), du sang de cordon ombilical (Srivastava et al., 1992) ou du sang circulant (Shwarz et al., 1992). Ces systèmes de culture sont peu productifs et nécessitent de l'érythropoïétine pour le maintien de la réplication viral. De plus, ils ne sont pas adaptés à une culture à long-terme (Heegaard et Brown, 2002).

## **VI. Physiopathologie**

Une inoculation de virus par voie nasale réalisée sur des volontaires adultes sains a permis de comprendre la physiopathologie du B19V (Anderson et al., 1985). Dès la

première semaine, une virémie brève du 6<sup>ème</sup> au 8<sup>ème</sup> jour et intense ( $10^{10}$  à  $10^{13}$  virus/ml) se produit accompagnée d'une lyse massive des précurseurs érythroïdes et d'une perte complète mais transitoire de ces cellules dans la moelle osseuse. Chez les sujets sains, ceci conduit à une baisse de l'hémoglobine sanguine, une fièvre et des myalgies. Cependant, chez les sujets souffrant de troubles hématologiques, la durée de vie des hématies étant plus courte, une telle perte engendre une crise érythroblastopénique sévère (Brown, 1997). Dix à douze jours après le début de l'infection, s'installe la réponse immunitaire de l'hôte avec l'apparition d'immunoglobulines (Ig) M, puis d'IgG (Brown et Young, 1997). La formation de complexes immuns coïncide avec le développement d'une éruption cutanée ou d'arthralgies (manifestations cliniques associées à l'infection par le B19V) et serait la cause de ces symptômes (Brown et Young, 1997). Chez le sujet porteur de déficit immunitaire, le virus persiste dans la moelle osseuse entraînant une virémie B19 récurrente (Brown et Young, 1997).

## **VII. Réponse immunitaire**

### ***VII.1. Réponse humorale***

L'infection de volontaires sains par inoculation nasale du B19V a permis d'étudier la réponse immunitaire (Anderson et al., 1985). Les IgM sont détectables vers le 12<sup>ème</sup> jour post-infection pendant environ trois mois, mais quelques fois ils peuvent persister plusieurs mois (Anderson et al., 1986). L'apparition des IgG est en revanche un peu plus tardive (deux semaines post-infection), mais elles persistent à vie et protègent d'une éventuelle réinfection (Modrow et Dorsch, 2002). L'apparition d'IgA a également été décrite. Elle est d'une courte durée et coïncide avec le début des symptômes cliniques (Erdman et al., 1991).

La réponse humorale dirigée contre le B19V est considérée comme un mécanisme de défense essentiel, du fait de l'efficacité thérapeutique de l'administration de fortes doses d'immunoglobulines à des patients infectés (Kurtzman et al., 1989 ; Schwarz et al., 1990). Historiquement, l'immunodominance a été essentiellement attribuée à la protéine de capsid VP1 et plus particulièrement à sa région unique VP1u (Rayment et al., 1990). Cette observation, basée sur l'absence d'anticorps dirigés contre des épitopes VP2

linéaires lors d'un criblage par immunobuvardage de type Western, est à présent erronée. Plusieurs équipes ont établi que les anticorps anti-VP2 persistent même après disparition de ceux dirigés contre VP1u (Kerr et al., 1999; Manaresi et al., 1999; Corcoran et al., 2000).

La première réponse anticorps consiste en des IgM anti-VP2, alors que la réponse mature implique des IgG essentiellement spécifiques de VP1u (Kurtzman et al., 1989; Gray et al., 1993).

La production de capsides vides en système baculovirus a permis d'étudier l'antigénicité des protéines VP1 et VP2 (Brown C.S. et al., 1991). Les pseudoparticules vides (VLPs) contenant VP2 seule et celles composées de VP2 et de VP1, présentent de légères différences (Kajigaya et al., 1991; Rosenfeld et al., 1994). La présence d'épitopes neutralisants a été mise en évidence dans plusieurs régions de VP2 (Brown et al., 1992; Sato et al., 1991) et de VP1u (Rosenfeld et al., 1992; Saikawa et al., 1993). La majorité des épitopes linéaires neutralisants se situent au niveau de VP1u et autour de la jonction VP1-VP2 (Saikawa et al., 1993), alors que ceux présents sur VP2 seront conformationnels (Brown et al., 1992; Sato et al., 1991).

Une réponse anticorps spécifique de la protéine non-structurale NS1 a également été décrite et serait un indicateur d'infection chronique (Hemauer et al., 2000; Von Poblitzki et al., 1995). Les épitopes majeurs de NS1 sont linéaires (Tolfvenstam et al., 2000).

La localisation des épitopes de neutralisation du B19V permettrait, comme ce fut le cas pour le parvovirus canin (CPV), le développement de stratégies vaccinales faisant appel à l'utilisation soit de VLPs, soit de peptides de synthèse.

### ***VII.2. Réponse cellulaire***

La réponse à médiation cellulaire n'a pas été étudiée autant que la réponse humorale. Selon certaines études, la population de cellules T effectrices serait de type CD4+, préférentiellement spécifiques à des protéines de structure (Franssila et al., 2001;



Von Poblitzki et al., 1996). De plus, Tolfvenstam a montré l'existence d'une réponse en lymphocytes CD8+ cytotoxiques dirigées contre des épitopes de NS1 (Tolfvenstam et al., 2001). Par ailleurs, un lien a été établi entre la production d'interleukine 6 (IL6) causée par NS1 (Moffatt et al., 1996), et les manifestations articulaires observées lors de l'infection par le B19V (Bataille et al., 1995). Des taux élevés de cette cytokine ont en effet été retrouvés au niveau des articulations de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde (Bataille et al., 1995). Enfin, il a été suggéré qu'une légère diminution de la réponse immunitaire de type cellulaire se produirait chez la femme enceinte ce qui augmenterait le risque d'infection fœtale par le B19V (Corcoran et al., 2003).

## **VIII. Manifestations cliniques**

### ***VIII.1. Chez le sujet immunocompétent***

Chez les sujets immunocompétents, l'infection par le B19V est souvent asymptomatique (Brown, 1997). Une étude épidémiologique a révélé que 25% des personnes infectées ne présentaient aucun signe clinique associé à une infection virale (Woolf et al., 1989). La présence de symptômes est engendrée suite à la réponse immunitaire dirigée contre le virus (Brown, 1997).

#### ***VIII.1.1. Érythème infectieux aigu (cinquième maladie)***

L'érythème infectieux est la manifestation clinique la plus répandue chez les enfants infectés par le B19V (Anderson et al., 1985). Cette manifestation cutanée est caractérisée par une éruption maculopapuleuse pouvant se propager au tronc et aux membres (Brown, 1997). Des symptômes pseudogrippaux, de la fièvre et des céphalées précèdent son apparition (Anderson, 1987). Les adultes infectés par le B19V ne présentent généralement pas cette dermatose (Anderson et al., 1985). Le début d'éruption coïncide avec l'apparition des IgM anti-B19V, ce qui laisse entendre que ce symptôme est d'origine immunologique, plus précisément lié au dépôt de complexes immuns au niveau de la peau (Gracia-Tapia et al., 1995). Cette pathologie a été décrite bien avant la découverte du B19V qui est depuis les années 80 son unique agent étiologique (Anderson et al., 1984; Naides et., 1988; Plummer et al., 1985).

### *VIII.1.2. Arthropathie*

L'arthropathie a été associée au B19V en 1985 (Reid et al., 1985) et constitue le symptôme le plus courant chez l'adulte, particulièrement chez les femmes (Woolf et al. 1989). Cette pathologie se présente comme une polyarthralgie symétrique affectant les petites articulations et pouvant s'étendre aux grandes articulations (Reid et al., 1985; White et al. 1985). Les signes cliniques disparaissent au bout de quelques semaines et même si dans certains cas, ceux-ci persistent pendant des mois voire des années, aucune destruction des articulations ne se produit (Brown, 1997). Comme dans le cas de l'érythème infectieux, le mécanisme de cette pathologie implique le dépôt de complexes immuns, sur le tissu synovial dans ce cas (Gracia-Tapia et al., 1995). Bien que l'ADN viral ait été détecté dans le fluide articulaire (Dijkmans et al., 1988) et dans le tissu synovial (Zakrzewska et al., 2001), aucun lien convainquant avec l'arthropathie érosive chronique n'a été démontré (Soderlund et al., 2002).

### *VIII.2. Chez la femme enceinte*

Lors d'une primo-infection au B19V chez la femme enceinte, le risque de transmission transplacentaire est d'environ 30 % (Gratacos, Torres, and Vidal, 1995 ; Yaegashi et al., 1998) et peut alors causer une anémie fœtale, un avortement spontané ou une anasarque (Brown et al., 1984 ; Heegaard and Hornsleth, 1995). Les données de séroprévalence indique qu'environ 50% des femmes enceintes sont susceptibles d'être infectées (Young et al., 2004). Dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique et dans certains cas, elle présente des signes tels qu'un exanthème et une arthralgie (Komischke, Searle et Enders., 1997 ; Harger et al., 1998). Ces signes étant souvent associés à la grossesse, l'infection par le B19 chez cette population peut passer inaperçue (Corcoran et Doyle, 2004).

Le B19V a été mis en cause dans l'anasarque fœtale non immunologique pour la première fois en 1984 (Brown et al., 1984). Le passage transplacentaire du virus via les cellules trophoblastiques, rendu possible grâce à la présence de l'Ag P à la surface de ces cellules (Jordan and DeLoia, 1999), est suivi de l'infection des précurseurs érythroïdes circulants, notamment ceux présents dans le foie et la moelle osseuse du fœtus (Morey et al., 1992), provoquant une anémie aggravée par la courte durée de vie des hématies chez

le fœtus (Brown et Young, 1997). Une insuffisance cardiaque en découle, conduisant à l'anasarque fœtale (Morey et al., 1992). Les symptômes observés à l'échographie comprennent l'œdème sous-cutané, les épanchements pleuraux et péricardiques, ainsi que l'œdème placentaire (Levy et al., 1997). Le taux d'anasarque non immune due à l'infection par le B19V est estimé de 15 à 20% (Yaegashi et al., 1998). Cependant, certaines études ont démontré la présence du B19V au niveau moléculaire dans 18 % à 27 % des cas d'anasarque non immune (Markenson et Yancey., 1998).

La cause de la survenue d'un avortement spontané n'est pas connue, mais un lien avec une atteinte multi-systèmes des organes a été suggéré (Levy et al., 1997). Plusieurs études ont constaté un taux plus élevé de fausses-couches lorsque l'infection était contractée avant 19 ou 20 semaines de gestation (Miller et al., 1998 ; Rodis et al., 1990 ; Rodis et al., 1998). Ceci peut être attribué, du moins en partie, à l'immaturité du système immunitaire du fœtus à ce stade (Corcoran and Doyle, 2004).

### ***VIII.3. Chez les patients souffrant de troubles hématologiques***

Six ans après la découverte du B19V, la première pathologie qui lui fut associée est la crise érythroblastopénique. Celle-ci a initialement été décrite chez des patients porteurs d'une anémie hémolytique constitutionnelle (Pattison et al., 1981). Le B19V est responsable de 70 à 80% des crises érythroblastopéniques chez les individus prédisposés à une telle pathologie (Anderson et al., 1982; Chorba et al., 1986; Lefrere et al., 1986). Le taux de destruction des hématies chez ces sujets, est élevé et une infection aiguë par le B19V, dont le cycle viral aboutit à la lyse des précurseurs érythroïdes, conduit à un arrêt brutal de l'érythropoïèse se traduisant par une anémie sévère (Young et al., 2004).

### ***VIII.4. Chez les sujets immunodéprimés***

Les sujets immunodéprimés, incluant les malades atteints du SIDA, d'un cancer, les transplantés ainsi que les patients recevant une chimiothérapie, constituent une population particulièrement à risque pour l'infection au B19V (Young, 1996). Chez ce groupe, l'organisme étant incapable d'éliminer le virus, l'infection est par conséquent chronique et peut persister à long terme, causant ainsi une anémie chronique qui peut s'accompagner d'une thrombopénie et d'une neutropénie (Kurtzman et al., 1989). Le

développement de symptômes liés à la réponse humorale, tels qu'une éruption cutanée ou des douleurs articulaires, est en général absent; cette réponse immunitaire étant inefficace chez ces sujets (Kosh et al., 1990; Kurtzman et al., 1987). Le B19V a été retrouvé chez des patients infectés par le VIH (Abkowitz et al., 1997 ; Chernak et al., 1995 ; Van Elsacker-Neile et al., 1996 ; Clarke et Lee, 2003 ), chez des sujets ayant subi une greffe (Rerolle et al., 2004 ; Cavallo et al., 2003 ; Weiland et al, 1989) ou sous chimiothérapie (El-Mahallawy et al., 2004 ; Kuo et al., 2002 ).

Toutes les pathologies classiquement associées au B19V et décrites précédemment sont résumées dans le *Tableau 1*.

#### ***VIII.5. Manifestations cliniques rares***

L'infection par le B19V a été corrélée à la survenue de différentes pathologies, telles que des hépatites fulminantes (Langnas et al., 1995; Sokal et al., 1998; Karenyi et al., 1999), des encéphalites (Barah et al., 2001; Skaff and Labiner, 2001) et des myocardites (Munro et al., 2003 ; Dettmeyer et al., 2003). Par ailleurs, la présence d'anticorps anti-B19 et du génome viral a été rapportée dans le cas de vascularites (Finkel et al., 1994), de la maladie de Kawazaki (Nigro et al., 1994) et du purpura d'Henoch-Schönlein (Ferguson et al., 1996).

L'association du B19V avec ces pathologies n'est toutefois pas confirmée par d'autres auteurs (Cohen, 1994 ; Yoto et al., 1994 ; Heegaard et Taaning, 2002 ; Wong, Young et Brown, 2003).

Le scepticisme vis-à-vis de telles données vient du fait qu'elles sont souvent basées sur des études de cas ou encore sur la recherche de l'ADN viral par PCR sans groupe témoin (Heegaard and Brown, 2002).

#### ***VIII.6. Persistance***

L'absence d'une réponse humorale efficace engendre une persistance du B19V dans l'organisme. Une aplasie pure de la lignée érythroblastique peut en être la

***Tableau 1*** : Principales manifestations cliniques liées à une infection par le B19V.

## Pathologies liées directement au virus

Terrain	Pathologie
Sujet sain immunocompétent	Asymptomatique Fièvre ou syndrome pseudogrippal
Femme enceinte	Avortement Anasarque foeto-placentaire, mort foetale <i>in utero</i>
Sujet porteur d'une anémie hémolytique constitutionnelle	Crise érythroblastopénique (anémie aiguë)
Sujet immunodéprimé	Anémie chronique

conséquence (Young et Brown, 2004). Cette pathologie associée à la persistance du B19V a été rapportée dans le cas de patients recevant une chimiothérapie ou un traitement immunosuppresseur (Kurtzman et al., 1988; Plentz et al., 2004) et également chez des sujets atteints du SIDA (Frickhofen et al., 1990; Setubal et al., 2003).

L'ADN viral a été mis en évidence dans différents tissus de patients, tels que le foie (Karenyi et al., 1999), le myocarde (Kuhl et al., 2003) et surtout la moelle osseuse et le tissu synovial (Cassinotti et al., 1998; Hokynar et al., 2000; Zakrzewska et al., 2001).

Le mécanisme de persistance du B19V est inconnu. Les similitudes structurales entre l'ADN du B19V et celui de l'adéno-associated virus (AAV), pourraient laisser penser que la persistance se ferait par intégration du génome viral dans le génome cellulaire (Soderlund-Venermo et al., 2002). La persistance sous forme épisomale est également concevable (Soderlund-Venermo et al., 2002).

Dans la plupart des études mentionnées, la recherche de l'ADN viral a été réalisée par PCR. Malgré la sensibilité de cette technique, l'interprétation des résultats demeure délicate. L'utilisation de groupes témoins constitués de sujets sains éviterait des fausses conclusions (Soderlund-Venermo et al., 2002).

## **IX. Épidémiologie et transmission**

### ***IX.1. Épidémiologie***

Le B19V est à priori strictement humain. L'infection par ce virus est commune et répandue dans le monde entier avec des taux d'infectivité similaires entre les États-Unis, l'Europe et l'Asie (Young et Brown, 2004). Seules certaines tribus et populations isolées n'ont pas été exposées (Schwarz et al., 1989; de Freitas et al., 1990). L'infection par le B19V survient sous formes de poussées épidémiques se produisant à la fin de l'hiver et pendant le printemps (Anderson, 1987). La prévalence des IgG spécifiques du B19V varie selon l'âge : 2 à 5% chez l'enfant entre 1 et 5 ans; 15 à 60% entre 6 et 19 ans; 30 à 60% chez l'adulte et plus de 80% au sein de la population gériatrique (Anderson et al., 1986; Cohen et Buckley, 1988; Kelly et al., 2000; Tsujimura et al.,

1995). Malgré cette prévalence des anticorps dans la population en général, la virémie ou la détection d'ADN viral est rare. Des études ont montré que la fréquence d'une virémie au B19V chez des donneurs de sang volontaires varie de 0.003% et 0.6% (Tsujimura et al., 1995; Wakamatsu et al., 1999; McOmish et al., 1993; Jordan et al., 1998; Zaaijer et al., 2004; Henriques et al., 2005). La variabilité dans ces données reflète la différence dans les techniques utilisées, les zones géographiques visées, ainsi que la saison (épidémique ou non) (Laub et Strengers, 2002). Le taux annuel de séroconversion chez la femme en âge de procréer est estimé à 1,5% durant les périodes endémiques et 13% en périodes épidémiques (Koch and Alder, 1989; Valeur-Jensen et al., 1999).

### ***IX.2. Transmission***

La transmission du B19V se fait communément par voie aérienne (Anderson et al., 1985). L'ADN viral a en effet été détecté dans les sécrétions respiratoires (Plummer et al., 1985). Un passage vertical de la mère au fœtus est également possible (Clewley et al., 1987; Miller et al., 1998; Skjoldebrand-Sparre et al., 2000). Enfin, le B19V peut être transmis par voie sanguine après transfusion de produits dérivés du sang (Williams et al., 1990; Santagostino et al., 1994; Laub et Strengers, 2002). Des études ont rapporté des cas de transmission du B19V après injection de facteurs de coagulation à des sujets atteints d'hémophilie, malgré un traitement préalable de ces produits par la chaleur (Blumel et al., 2002; Bartolomei Corsi et al., 1988) et par des solvants/détergents (Gaboulaud et al., 2002; Azzi et al., 1992; Lefrere, Mariotti, et Thauvin, 1994). L'incorporation d'un grand nombre de donations dans le pool de départ servant à la préparation des facteurs de coagulation, rend le risque de contamination élevé; le B19V étant très répandu dans la population de donneurs (Laub et Strengers, 2002). Par ailleurs, l'absence d'une enveloppe lipidique rend le B19V résistant aux différentes techniques employées pour le traitement de ces facteurs de coagulation (Brown, 1997). Une variété de méthodes d'inactivation/d'élimination du virus sont en cours de développement; les plus prometteuses étant la nanofiltration (Yokoyama et al., 2004;



Omar et Kempf, 2002) et l'utilisation de rayons ultra-violet (Caillet-Fauquet et al., 2004; Sugawara et al., 2001).

## **X. Diagnostic**

### ***X.1. Méthodes de diagnostic direct***

Du fait de son tropisme extrêmement restreint et du manque de lignées cellulaires permissives, le B19V est excessivement difficile à cultiver (Levy et al., 1997). D'autres méthodes de diagnostic de l'infection sont, par conséquent, utilisées en laboratoire. Une identification histologique, en se basant sur la présence d'inclusions intranucléaires caractéristiques, suggère une infection par le B19V, mais ne doit pas être considérée seule pour établir le diagnostic (Heegaard et Brown, 2002). En effet, ces cellules sont souvent absentes dans le cas de patients HIV positifs ou d'infections chroniques (Heegaard et Brown, 2002). Le B19V peut être détecté directement dans le sérum des patients, par microscopie électronique, par ELISA et même par hémagglutination grâce à la présence de particules virales (Heegaard et Brown, 2002; Levy et al., 1997). Cependant, ces procédés ont été abandonnés au profit de techniques moléculaires visant la recherche de l'ADN viral (Zerbini et al., 2002; Onitilo and Shaw, 2005; Bergallo et al., 2006). La technique d'hybridation directe utilisant des sondes radioactives (Clewley, 1985; Sevall, 1990) ou non-radioactives (Musiani et al., 1991; Prato, Paper and Morinet; 1991), fut le premier outil employé dans ce sens. Les résultats du test d'hybridation sont aisément quantifiables avec un seuil de détection d'environ  $10^5$  copies de génome viral/ml (Heegaard and Brown, 2002). Des techniques d'hybridation in situ sur tissu ont également été mises au point (Schwarz, Nerlich and Hillemanns, 1993; Gentilomi et al., 1993; Wright, 1998). Néanmoins, malgré leur sensibilité, des taux de virémie bas peuvent échapper à ces techniques. L'arrivée de l'amplification génique a pallié ce problème en augmentant considérablement la sensibilité des techniques de détection de l'ADN viral, aussi bien dans le sérum que dans les tissus de patients (Salimans et al., 1989; Dieck et al., 1999; Zerbini et al., 2002; ). Un tel avantage fait de la PCR la technique de prédilection, bien que celle-ci présente un inconvénient majeur: le risque de contamination pouvant mener à des résultats faussement positifs (Heegaard et Brown, 2002; Young et Brown., 2004).

### *X.2. Méthodes de diagnostic indirect*

Le diagnostic indirect du B19V consiste en la détection d'anticorps spécifiques des protéines de capsid du virus. Du fait de l'extrême difficulté à produire du B19V en culture, les capsides virales servant pour les tests sérologiques, étaient initialement extraites à partir de sérums présentant un haut titre viral (Anderson et al., 1987). L'utilisation d'antigènes du B19V exprimés dans un système procaryote s'est révélée susceptible de produire des résultats faussement négatifs et ce, en raison de l'absence d'épitopes conformationnels (Jordan, 2000). Depuis qu'il a été démontré que l'expression des deux protéines de capsid VP1 et VP2 dans le système baculovirus aboutit à des pseudoparticules vides (VLPs) antigéniquement similaires au B19V natif (Kajigaya et al., 1989; Franssila et al., 2001; Ballou et al., 2003) et que ce système fournit de bons rendements en terme d'expression, ces VLPs sont utilisées dans les tests sérologiques commerciaux actuels (Gray et al., 1993; Kock, 1995; Salimans et al., 1992).

Une infection récente est confirmée par la présence d'IgM, une ancienne par celle d'IgG (Anderson et al., 1985). Les IgM sont recherchés par une technique d'immunocapture utilisant des VLPs composées de VP2 et ayant une sensibilité de 89,1% et une spécificité de 99,4% (Doyle et al., 2000). La technique utilisée pour la recherche des IgG est un test ELISA utilisant également des VLPs constituées de VP2 (Heegaard et al., 2002). En vue d'améliorer le diagnostic de l'infection par le B19V, des équipes se sont intéressées aux anticorps dirigés contre la protéine non-structurale NS1. Certains groupes ont associé l'apparition des IgG anti-NS1 à une infection persistante (Von Poblitzki et al., 1995); d'autres contestent cet avis (Jones et al., 1999; Venturoli et al., 1998). De plus, aucun lien n'a pu être établi entre ces anticorps et la pathogénie du B19V (Mitchell, Leong and Rosenke, 2001). Il a, en revanche, été suggéré que leur présence pourrait être un marqueur d'une infection récente et par conséquent, leur détection servirait à améliorer le diagnostic (Ennis et al., 2001; Heegaard et al., 2002).

## **XI. Traitement**

Chez les sujets immunocompétents, dans la majorité des cas, l'infection par le B19V ne requiert pas un traitement spécifique. Cependant, chez certains patients souffrant d'arthropathie liée au virus, l'administration d'un traitement symptomatique, tels que des anti-inflammatoires, peut se révéler nécessaire.

Une crise érythroblastopénique transitoire causée par le B19V peut être résolue lorsqu'un taux satisfaisant d'hémoglobine est obtenu suite à la transfusion d'érythrocytes (Harris, 1992).

Chez la femme enceinte, en cas de séroconversion, une surveillance échographique régulière, ainsi qu'une amniocentèse sont à réaliser (Schild et al., 1999). La transfusion in utero est le seul traitement proposé dans le cas d'une anasarque (Rodis et al., 1998). Elle permettrait de diminuer la mortalité de 50% selon certaines études (Schild et al., 1999).

Dans le cas d'une infection persistante, l'administration d'immunoglobulines, qui est une bonne source d'anticorps neutralisants, à raison de 0.4g/kg/j pendant 5jours, s'est révélée efficace et souvent curative (Kurtzman et al., 1989; Frickhofen et al., 1990). Cependant, la répétition d'un tel traitement peut être nécessaire chez les sidéens, en raison de la persistance du B19V à des taux plus faibles mais détectables, conduisant à une rechute (Koduri et al., 1999).

Enfin, sur le plan prophylactique, l'utilisation de particules recombinantes vides du B19V, exprimées dans le système baculovirus, comme vaccin, a été suggérée. En effet, ces particules induisent une réponse en anticorps neutralisants chez des animaux (Kajigaya et al., 1991). Malgré les résultats prometteurs des tests cliniques de phase I (Heegaard and Brown, 2002), l'étude n'a pas été menée à terme (Young et Brown, 2004). Une telle prophylaxie est importante en particulier pour trois populations : i) les patients souffrant de troubles hématologiques, notamment une anémie hémolytique

constitutionnelle, les rendant sensibles à une crise érythroblastopénique, ii) les sujets porteurs de déficit immunitaire acquis ou congénital présentant une aplasie médullaire suite à la persistance du virus, iii) les femmes enceintes séronégatives à risque (Bansal et al., 1993; Young et Brown, 2004).

## **XII. Variabilité génétique**

En 1986, Shade et al. ont caractérisé et séquencé la première souche de B19V. Celle-ci, désignée par Pvbaua, a été isolée chez un enfant souffrant d'une érythroblastopénie (Shade et al., 1986). Par la suite, un grand nombre d'autres souches a été séquencé soit entièrement, soit partiellement. Le sérum de donneurs de sang (Ganillena et al., 1995; Fukada et al., 2000) et le liquide synovial de patients infectés (Hokynar et al., 2000) ont été les sources principales utilisées. Bien que des divergences de séquence aient été observées par différentes techniques (analyse du profil de restriction, séquençage et analyse du polymorphisme des produits de PCR), la variabilité génétique entre ces souches ne dépasse pas 2% (Fukada et al., 2000 ; Hemauer et al., 1999 ; Hokynar et al., 2000; Hemauer et al., 1996 ; Umene et Nunoue, 1993). Ces divergences concerneraient davantage les gènes codant les protéines de structure VP1 et VP2, plutôt que le gène de la protéine non structurale NS1 (Hemauer et al., 1996).

Des études comparatives entre des souches provenant de patients avec des manifestations cliniques diverses n'ont montré aucune corrélation entre les symptômes et la séquence du génome viral (Hemauer et al., 1996; Umene et Nunoue., 1991). Il a également été rapporté qu'il n'existe pas de génotype spécifique de l'infection persistante, puisque les génomes viraux extraits de tissus synoviaux dans le cas de cette infection, sont similaires à ceux issus soit du même type de tissu lors d'une infection aiguë, soit du sang ou de la moelle osseuse (Hokynar et al., 2000).

Néanmoins, certaines études ont décelé des divergences marquées au sein des souches isolées de patients ayant une infection persistante, notamment au niveau de la région unique de VP1 (VP1u) (4% au niveau de la séquence nucléotidique et 8,2% au

niveau de la séquence protéique) (Hemauer and al., 1996; Qian et al., 2003). Plus récemment, Hokynar et al. ont découvert un génotype du B19V, nommé K71, au niveau de biopsies de peau prélevées d'adultes généralement sains et de patients souffrant d'une maladie de peau indépendante du B19V (Hokynar et al., 2002). Une telle découverte évoque la possibilité d'une association diversité-persistance et diversité-type tissulaire.

La notion de diversité génétique faible au sein des érythrovirus humains, appuyée par l'absence de groupements phylogénétiques différents parmi ces virus (Hokynar et al., 2000; Lukashov and Goudsmit, 2001), a été rediscutée suite à la découverte de variants. Servant et al., ont suggéré une classification tel que le B19V (souche prototype Pvbaua) constituerait le génotype 1, les souches A6 (Nguyen et al., 2002), LaLi (Servant et al., 2002) et K71 (Hokynar et al., 2002) le génotype 2 et enfin les souches V9 (Nguyen et al., 1998), et D91.1 le génotype 3 (Servant et al., 2002). Le variant V9, le premier mis en évidence, possède une diversité génétique de plus de 12% avec les B19V (Heegaard, Panum Jensen, and Christensen, 2001). La souche K71 diverge de 10,8% avec le B19V et de 8,6% avec le V9 (Hokynar et al., 2002). Ces études indiquent que les érythrovirus humains sont bien plus variés que ce qui a été décrit auparavant. La fréquence de ces variants est en revanche très peu connue, essentiellement en raison du manque d'outils adéquats de détection et de distinction de tous les génotypes. En utilisant deux tests PCR commerciaux, Hokynar et al. ont analysé 140160 sérums de donneurs de sang, dans le but de définir la prévalence de ces différentes souches. Tous les sérums se sont révélés négatifs (Hokynar et al., 2004). Ce résultat venait confirmer celui obtenu par Heegaard et al., et selon lequel les infections par les nouveaux génotypes sont extrêmement rares (Heegaard et al., 2002). Cependant, dans une autre étude, la même équipe a retrouvé de l'ADN du génotype K71 dans 47% des biopsies de peau examinées (Hokynar et al., 2002). Bien que le spectre clinique associé aux génotypes 2 et 3 semble similaire à celui observé dans le cas du génotype 1 (Servant et al., 2002), l'éventualité de l'implication de ces génotypes dans d'autres maladies chez les humains reste à déterminer.

### XIII. La capsid virale

La capsid du B19V est composée de 60 copies de sous-unités protéiques, dont 95% de VP2 et 5% de VP1 (Ozawa et Young, 1987), arrangées de façon symétrique pour former un icosaèdre avec triangulation  $T=1$ . La capsid possède par conséquent trois axes de symétrie : 2, 3 et 5 (*figure 6*), et les interactions entre les monomères forment des doubles, triples et quintuples (Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996) pouvant créer des dimères, trimères et pentamères (*figure 7*) (Yuan et Parrish, 2001). Une telle structure répond à la stratégie universelle de la protection du génome viral, puisqu'elle offre une grande stabilité et une énergie libre minimale.

Bien que tous les parvovirus partagent les caractéristiques structurales d'une capsid icosaédrique, les divergences au niveau des topologies de surface (*figure 8*) dictent un tropisme et un récepteur cellulaires différents.

La surface de la capsid de tous les parvovirus dont la structure tridimensionnelle a été déterminée (FPV, MVM, GmDENV, AAV-2, PPV), présente des dépressions nommées « fossettes » au niveau de l'axe de symétrie 2 ; des canaux cylindriques entourant l'axe de symétrie 5 et enfin des protubérances sous forme de spicules à l'axe de symétrie 3. L'absence de ces dernières chez le B19V constitue la différence principale entre la surface de sa capsid et celle des autres parvovirus (Agbandje et al., 1994); la raison en est que les boucles 3 et 4 qui forment cette région sont plus courtes chez le B19V (Kaufmann, Simpson et Rossmann, 2004). Récemment, suite à une comparaison des topologies de la surface de certains parvovirus de structure connue, Padron et al. ont suggéré une classification de ces virus, en trois groupes : le groupe I, comprenant le CPV, le FPV, le MVM et le PPV ; le groupe II composé seulement du DENV ; et le groupe III avec comme membres, les AAV2, 4 et 5, l'ADV et le B19. Les différences entre les trois groupes se situent essentiellement autour des axes de symétrie 3 et 2 (Padron et al., 2005). Cette classification est purement topologique et ne découle en aucun cas de similarités du tropisme, de la pathogénicité, de l'antigénicité ou encore des sites d'attachement au récepteur cellulaire.

**Figure 6** : Représentation schématique d'une capsidie icosaédrique (modifié de l'article Reguera et al. 2004).

Les traits foncés délimitent un des 20 trimères formant la capsidie. Les trois monomères de VP2 dans ce trimère sont indiqués par les chiffres 1, 2 et 3. Les axes de symétrie 2, 3 et 5 sont représentés par des couleurs différentes.

**Figure 8 :** Structures de parvovirus à faible résolution.

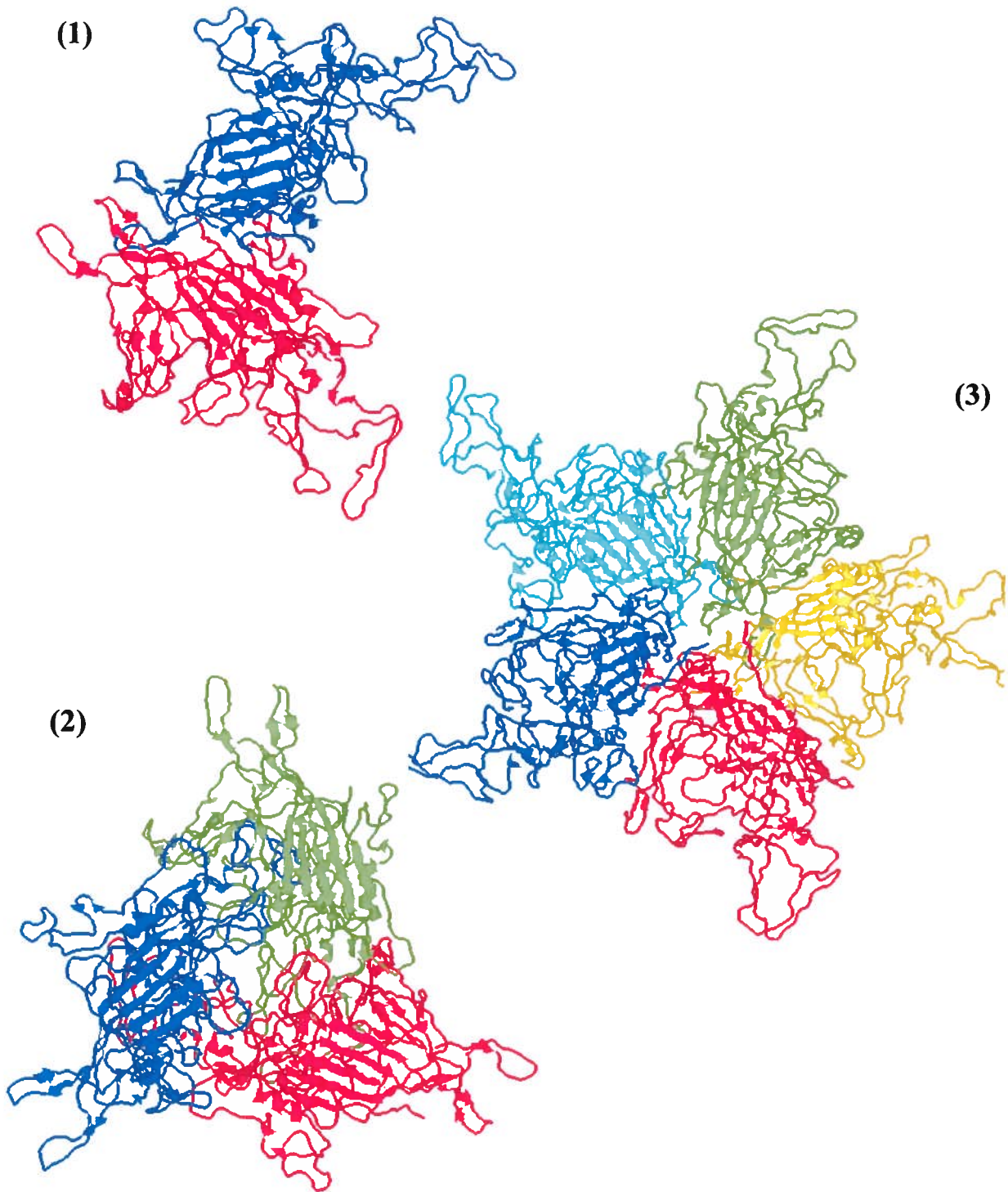
Comparaison de la topologie de la structure de surface du AAV2, du AAV4, du AVV5, ADV, CPV, DNV, FPV, MVM et PPV, tous représentés avec une couleur différente (Padron et al. 2005). Les structures représentées dans la première et la troisième lignes ont été déterminées à partir de modèles pseudoatomiques. Les structures dans la seconde ligne ont été obtenue en cryo-microscopie électronique.

2f : 2-fold (axe de symétrie 2)

3f : 3-fold (axe de symétrie 3)

5f : 5-fold (axe de symétrie 5)



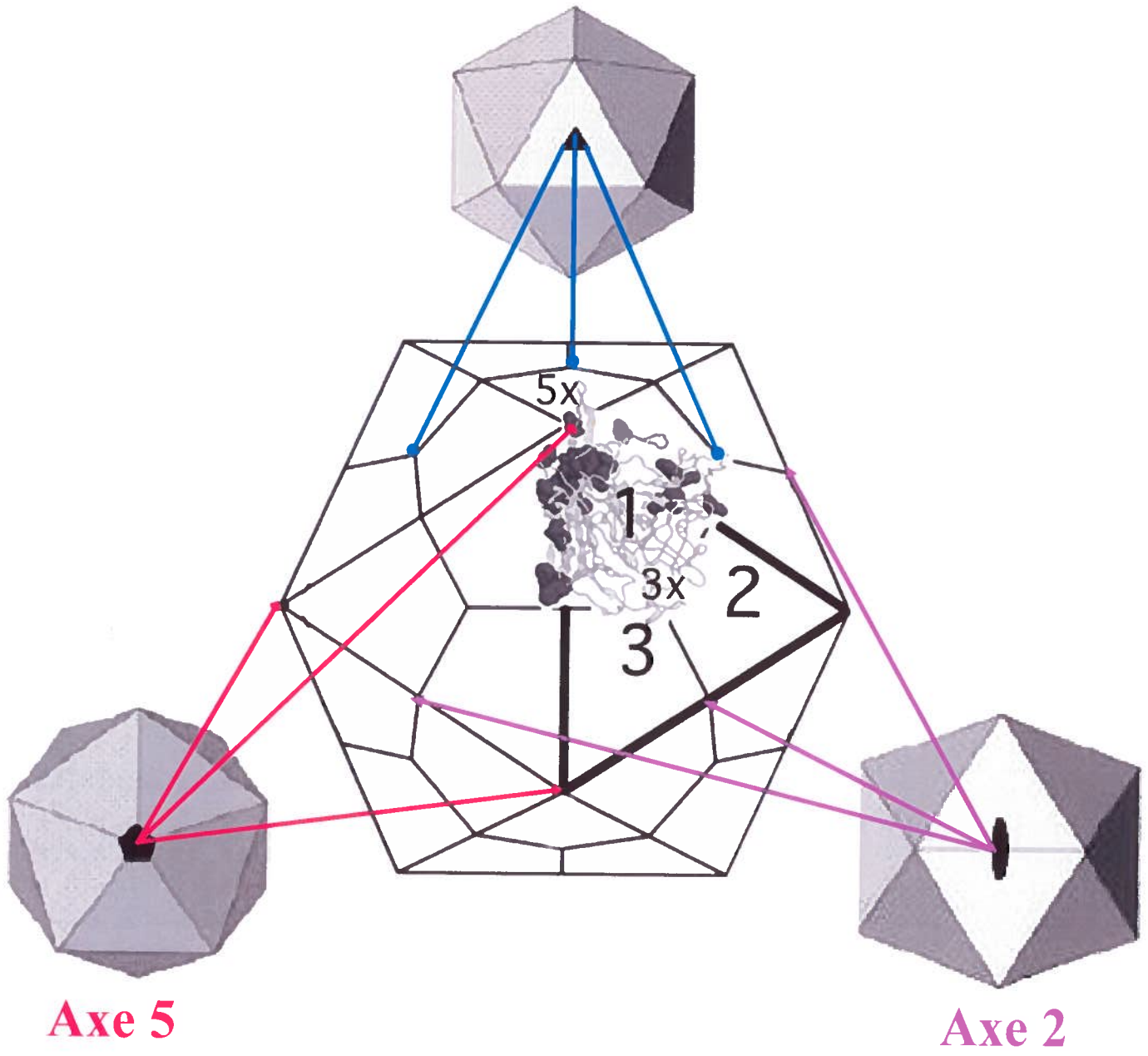


**Figure 7 :** Représentation de l'association des sous-unités VP2 de la capsid du B19V.

La représentation a été réalisée à l'aide du programme de visualisation de structures tridimensionnelles « protein explorer ». Chaque couleur représente une sous-unité VP2.

- (1) Dimère : Association de sous-unités VP2 à l'axe de symétrie 2;
- (2) Trimère : Association de sous-unités VP2 à l'axe de symétrie 3 ;
- (3) Pentamère : Association de sous-unités VP2 à l'axe de symétrie 5.

**Axe 3**



**Axe 5**

**Axe 2**



### *XIII.1. Structure*

La structure du virion B19V définie en cryomicroscopie électronique est illustrée par la *figure 9* (Chipman et al., 1996). En 1994, Agbandje et al. ont également déterminé, par diffractions aux rayons X après cristallisation, la structure tridimensionnelle de particules recombinantes vides (VLPs) composées de la protéine de structure VP2 (VLPs-VP2) du B19V, à une résolution de 8Å (Agbandje et al., 1994). Cette analyse montre un motif central formé de huit feuillets  $\beta$  anti-parallèles ayant les mêmes positions et orientation que ceux du FPV et du CPV. Une autre similarité avec ces deux virus se situe dans la partie basse interne des structures cylindriques, aux axes de symétrie 5. Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence l'absence de spicules à la surface du B19V, mentionnée précédemment (Agbandje et al.1994).

Des VLPs-VP2 ont également été analysées, seules ou en association avec leur récepteur cellulaire (globoside), à une résolution de 26Å. Un site d'attachement a été localisé au niveau des dépressions situées aux axes de symétrie 3 de ces particules (Chipman et al., 1996).

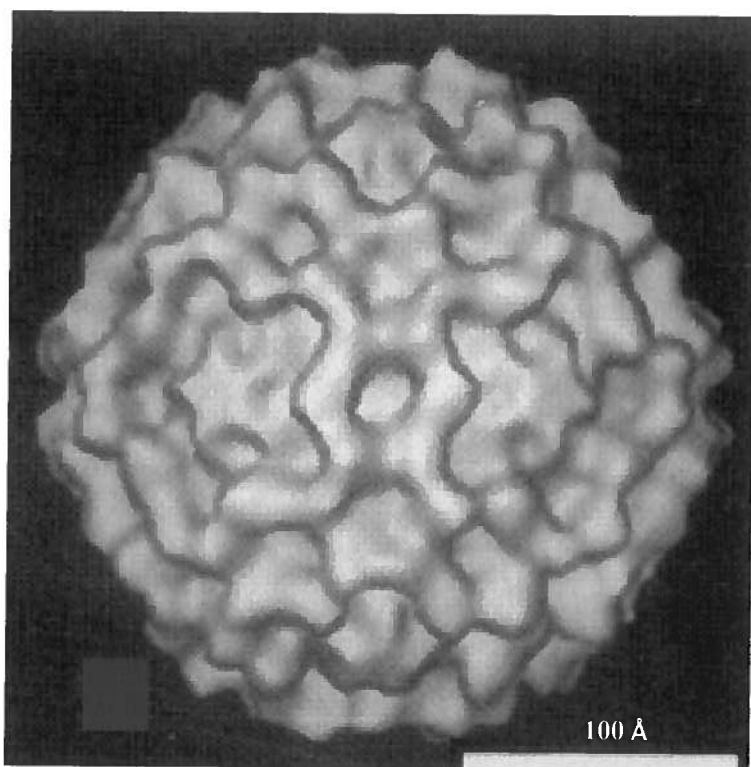
Récemment, une analyse plus fine ( $\approx 3,5$  Å) de VLPs-VP2 a montré que la connexion entre les feuillets  $\beta$  est matérialisée par de larges boucles. Ces dernières « décorent » les deux tiers de la structure de la capsid et sont à la base des différences de surface entre le B19V et les autres parvovirus (Kaufmann et al., 2004). Par ailleurs, le pore situé au bout du canal cylindrique est de seulement  $\approx 9$  Å dans le cas du B19V, contre  $\approx 18$  Å chez le AAV-2 (adeno-associated-virus 2) et  $\approx 14$  Å chez le FPV. De toutes les structures de parvovirus disponibles, la plus proche du B19V est celle du AAV-2 (Kaufmann et al., 2004) et du AAV-4 (Padron et al., 2005).

### *XIII.2. Assemblage*

Étudier l'assemblage des capsides virales équivaut essentiellement à s'intéresser d'une part, aux interactions entre les sous-unités composant la capsid et d'autre part, aux régions impliquées dans ces interactions, ainsi que celles dont dépend la stabilité de la capsid. De telles études permettent de comprendre la relation structure-fonction et les

**Figure 9** : Cryomicroscopie électronique de la capsid du B19V.

La mesure indiquée définit 100 Å (Chipman et al. 1996).





résultats obtenus pourraient éventuellement être explorés pour le développement de vaccins thermostables et d'agents antiviraux empêchant l'assemblage de la capside ou provoquant sa dissociation (Reguera et al., 2004).

Dans le cas des parvovirus, les avancées vers l'accès au mystère de l'assemblage de leur capside, sont entravées principalement par la brachylogie des intermédiaires structuraux. Cependant, plusieurs études ont tout de même été entreprises, mais très peu sur le B19V.

### *XIII.2.1. Les intermédiaires structuraux et assemblage*

La structure avec triangulation  $T=1$  s'accorde avec la possibilité de l'implication d'intermédiaires d'assemblage sous forme de dimères, trimères ou pentamères (*figure 7*) pour former la capside virale (Yuan et Parrish, 2001). La majorité des travaux visant à faire la lumière sur le mécanisme d'assemblage chez les parvovirus, évoquent les trimères de protéines de structure comme intermédiaires dans la formation de leur capside. En effet, le nombre d'interactions au sein de ces trimères est bien plus important qu'entre ces derniers (Chapman et Rossmann, 1993), faisant de cet oligomère une sous-unité extrêmement stable. Xie et Chapman ont également montré que l'entrelacement de boucles autour de l'axe de symétrie 3 confère au trimère une barrière énergétique de dissociation plus importante comparée aux dimères et pentamères (Xie et Chapman, 1996). Par ailleurs, la VP2 du MVM ne semble être transportée au noyau que sous forme trimérique (Lombardo et al., 2000 ; Lombardo et al., 2002). Enfin, Yuan et Parrish ont réussi à matérialiser cette hypothèse en isolant des trimères à partir de cellules exprimant les protéines virales, dans le cas du CPV (Yuan et Parrish, 2001). De plus, dans l'étude de Xie et Chapman, il a également été montré, selon l'estimation des énergies libres d'association, que les liaisons entre les résidus situés aux axes de symétrie 3 et 5, se font prioritairement à celles de l'axe de symétrie 2 (Xie et Chapman, 1996).

L'importance des interactions quintuples dans l'assemblage de la capside a été suggérée dans le cas du CPV (Yuan et Parrish, 2001) et récemment confirmée par Farr et



Tattersall, puisque la mutation de nombreux résidus au niveau de cette région altère la formation de la capsid (Farr et Tattersall, 2004).

### *XIII.2.2. Localisation cellulaire de l'assemblage*

La question sur le compartiment cellulaire couvrant le processus d'assemblage demeure encore posée. La première réponse qui viendrait à l'esprit est «le cytoplasme », étant donné que les protéines structurales y sont traduites. Cependant, et bien que les capsides du AAV aient été détectées en premier lieu dans le noyau des cellules infectées (Hunter et Samulski, 1992; Wistuba et al., 1997), il n'est pas certain que ces capsides aient traversé, sous forme entière, les complexes de pore nucléaire (NPC), d'autant plus que la taille des particules virales (25nm) est à la limite du diamètre du NPC (Feldherr, Kallenbach, Schultz, 1984). D'après l'étude menée sur le MVMi par Lombardo et al., l'assemblage des capsides est plutôt nucléaire et précédé par celui des trimères dans le cytoplasme (Lombardo et al., 2000). La translocation de ces sous-unités au noyau devient possible grâce au motif de localisation nucléaire NLM (plus d'un segment de résidus forment le NLM) crée à leur périphérie dès leur formation (Lombardo et al., 2000). La participation de VP1, qui porte aussi bien un NLM qu'un signal de localisation nucléaire NLS (contient un seul segment de résidus), dans le transport nucléaire des trimères, a également été évoquée (Lombardo et al., 2000; Ruffing et al., 1992; Gilbert et al., 2005). Le schéma proposé par Lombardo et al., est représenté par la *figure 10*. Chez le B19V, un site NLS (acides aminés 493-503) a été identifié à l'extrémité C-terminale de sa protéine VP2 (Kaufmann et al., 2004). Cette séquence est conservée à travers les érythrovirus (Pillet et al., 2003) et son emplacement est quasiment similaire à celui du MLN présent chez le MVMi (Lombardo et al., 2000). Le NLS du B19V est exposé à la surface de la VP2 monomérique, rendant possible sa reconnaissance par les NPC, et devient inaccessible dès l'assemblage de la capsid (Kaufmann et al., 2004).

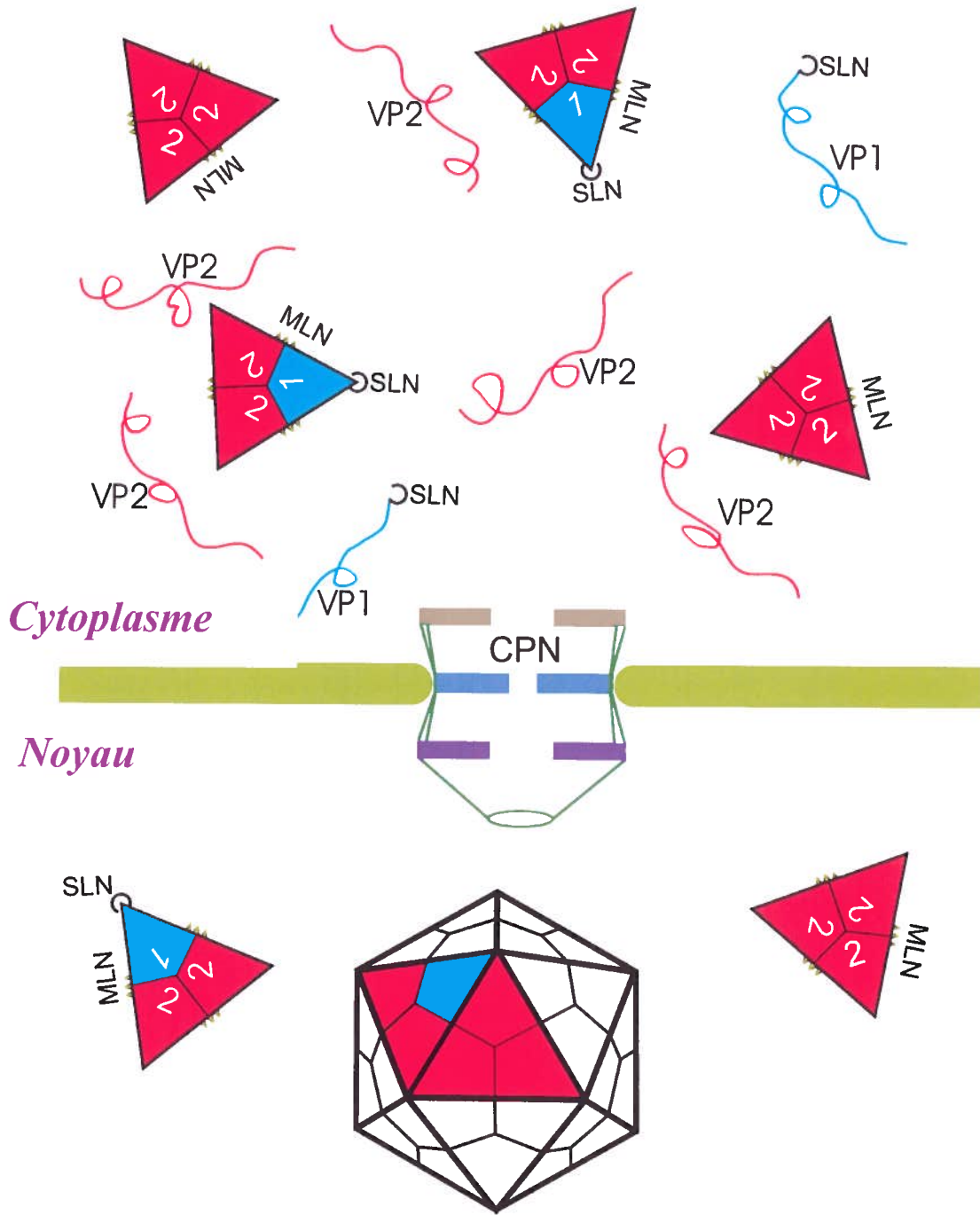
*Figure 10* : Rôle des signaux de transport nucléaire.

Trois types de trimères sont formés et possèdent la même capacité à transloquer dans le noyau. Seuls les trimères correctement repliés entrent dans le noyau pour s'assembler en capsides (Lombardo et al., 2000).

**CPN** : Complexe de pore nucléaire

**MLN** : Motif de Localisation Nucléaire

**SLN** : Signal de Localisation Nucléaire



### ***XIII.3. Capsides recombinantes (VLPs)***

Les VLPs formées par la protéine structurale majoritaire VP2 des parvovirus, produite dans un système d'expression, possèdent une structure et des propriétés physiques, incluant la thermostabilité, très similaires aux capsides natives (Wu et Rossmann, 1993 ; Agbandje-McKenna et al., 1998 ; Hernando et al., 2000 ; Yuan et Parrish, 2001). De ce fait, ces VLPs sont une opportunité pour l'établissement des étapes du mécanisme d'assemblage de ces virus, notamment dans le cas du B19V qui est difficilement cultivable (Wu et Rossmann, 1993; Carreira et al., 2004). En effet, plusieurs travaux ont été réalisés sur l'expression ou non de VLPs à partir de protéines de capsides mutées, notamment au niveau de leurs régions conservées. Le but visé étant de déterminer les régions, ainsi que les intermédiaires structuraux, impliqués dans la formation de la capside (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002; Hansman et al, 2005; Taylor et Johnson, 2005). Les résultats de ces recherches offrent des indications quant à l'importance ou non de certains domaines (Paintsil et al., 1996; Taylor et Johnson, 2005; Touze et al., 2000; Wong et al., 1994), leur implication ou non dans la liaison entre les sous-unités structurales, ainsi que le rôle de celles-ci dans le contrôle de la stabilité et la taille des particules (Bertolotti-Ciarlet et al., 2002).

Dans le cas du B19V, il a été, entre autres, démontré que la quasi-totalité (>31 acides aminés) de la région N-terminale de VP2 est nécessaire pour la formation de la capside du B19V, limitant ainsi les délétions ou substitutions possibles au niveau de cette région dans le cas de production de capsides chimériques (Kawase et al., 1995). La région VP1u, partie exposée à la surface de la capside (Rosenfeld et al., 1992), présente en revanche un site idéal pour ce type de construction, puisque son absence n'altère pas l'auto-assemblage (Kawase et al., 1995).

### ***XIII.4. Acides aminés : importance, différence et conservation de séquences***

La distribution des acides aminés au sein de la capside virale n'est pas le fruit du hasard. Elle répond aux exigences propres au virus, ainsi qu'à celles imposées par les interactions de ce dernier avec l'extérieur (récepteurs cellulaires, molécules du systèmes immunitaires, etc...).

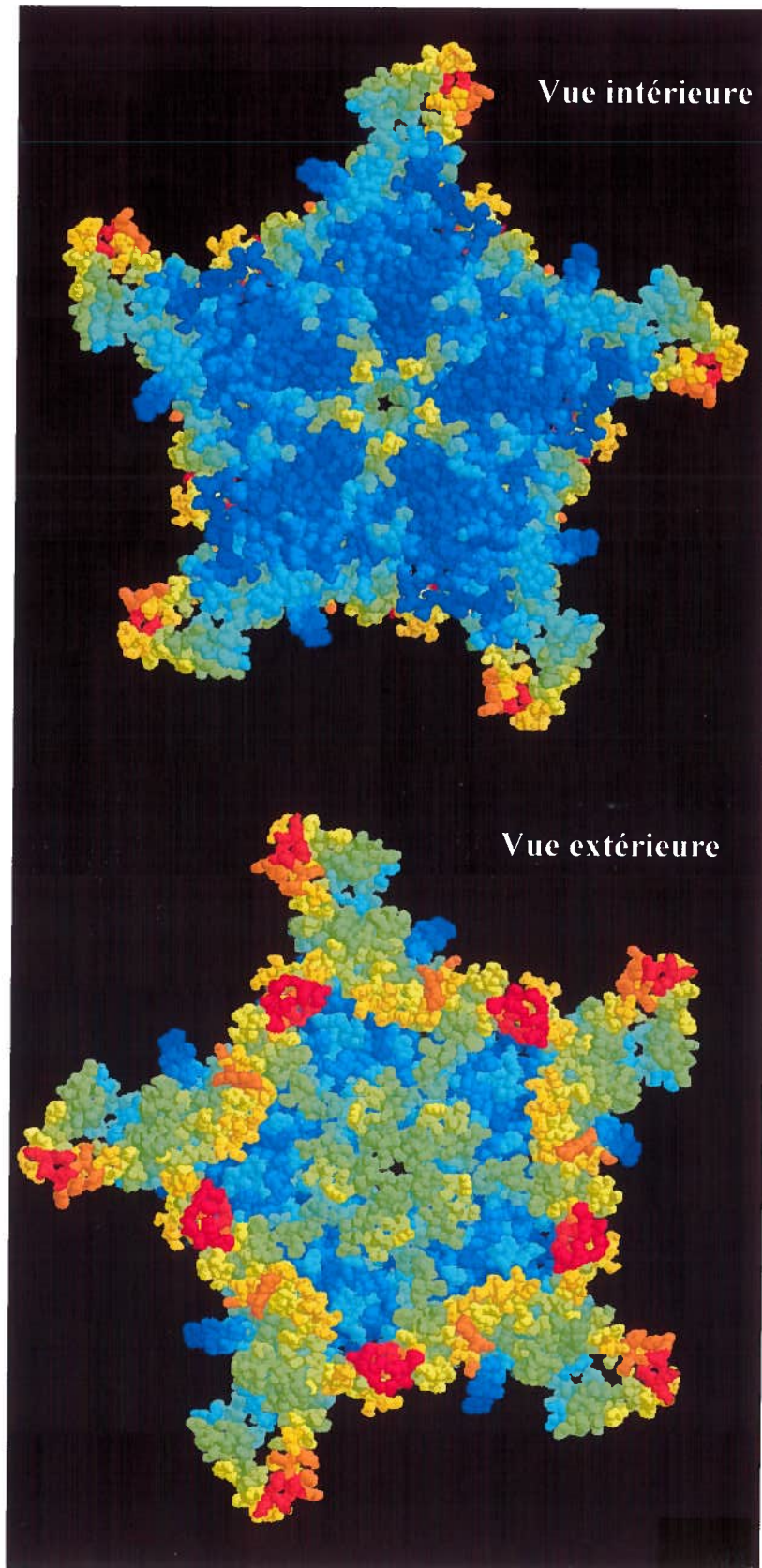
Selon l'étude de Reguera et al., seulement quelques résidus, impliqués dans des interactions non-covalentes et donc de plus forte énergie, contribuent à l'assemblage de la capsid virale et à sa stabilité (Reguera et al., 2004). Au contraire, les acides aminés non-indispensables à cet effet sont de plus faible énergie et sont dispersés à la périphérie du trimère (Reguera et al., 2004).

Une région riche en glycine, située à proximité de la partie N-terminale de VP2 et occupant le canal cylindrique, est commune à tous les parvovirus autonomes (Chapman et Rossmann, 1993; Chapman et Rossmann, 1995). Cette séquence, dont la flexibilité permet l'exposition de la région N-terminale de VP1 (Simpson et al., 1998), est plus courte (12 à 17 acides aminés) chez le B19V, comparée à celle des autres parvovirus (Kawase et al., 1995), rendant son canal cylindrique de plus petite taille (Kaufmann et al., 2004). Un motif Gly- Gly- Gly (acides aminés 136 à 138) a également été localisé au bout de chaque boucle formant le canal cylindrique. Cette séquence procurerait une souplesse au mouvement d'ouverture et fermeture du pore du cylindre, en présence de la VP1u (Kaufmann et al., 2004).

L'observation de la répartition des acides aminés selon leur stabilité, dans un pentamère du B19V, montre que les résidus situés à l'intérieur de la capsid sont plus stables et en général plus conservés que ceux occupant sa surface (*figure 11*). Une vue de l'extérieur laisse également constater une concentration de résidus stables autour du canal cylindrique. Ces résidus sont hautement conservés à travers les érythrovirus (acides aminés 160-177, 182-194, 206-216, 246-257, 511-524 et 534-543) et correspondent, en partie, au site d'attachement du virus au co-récepteur cellulaire, ce qui suggère une similarité des molécules d'attachement cellulaires parmi ces virus (Kaufmann et al., 2004). Par ailleurs, les deux régions conservées 511-524 et 534-543 encadrent une séquence sous forme de boucle externe, singulière aux érythrovirus, qui, cependant, diffère considérablement entre le parvovirus humain B19V et ses analogues animaux (Kaufmann, Simpson et Rossmann, 2004). Cette boucle pourrait jouer un rôle dans le tropisme viral.

**Figure 11** : Stabilité des acides aminés de la capside.

Les résidus sont représentés dans un pentamère de VP2 vu de l'intérieur et de l'extérieur de la capside. La stabilité est décroissante en passant de la couleur bleue à la couleur rouge. Les résidus situés à l'intérieur, ainsi que ceux entourant l'axe de symétrie 5, sont plus stables que le reste des résidus du pentamère. Cette représentation a été réalisée en utilisant le programme de visualisation de structures tridimensionnelles « protein explorer ».



Néanmoins, une neutralisation du virus par un anticorps spécifique de la séquence 520-540, n'a pu être obtenue (Sato et al., 1991). Ceci laisse penser que la boucle évoquée précédemment n'est pas directement impliquée dans l'entrée du virus dans sa cellule hôte (Kaufmann et al., 2004). Une étude sur le MVMi a montré que la mutation d'acides aminés entourant le pore du canal cylindrique, non seulement entrave l'exposition de la région N-terminale de la VP2, mais altère également la conformation de la capsid (Reguera et al., 2004).

Enfin, l'alignement des séquences de la VP2 de divers parvovirus, révèle la présence de régions hautement conservées (Chapman et Rossman, 1993), dont la première, mentionnée précédemment, consiste en une séquence polyglycine, la seconde est localisée près de la surface interne et de l'axe de symétrie 5, la troisième se trouve à l'extrémité C-terminale de la protéine de capsid. Enfin la quatrième, essentiellement hydrophobe, est dissimulée. Il existe une cinquième région commune à tous les parvovirus excepté le B19V et le Densovirus et qui est située à l'extrémité C-terminal du second feuillet B (Chapman et Rossmann, 1993).

#### ***XIII.5. Acides aminés mutés dans cette étude***

Dans la présente étude, les acides aminés de VP2 : asparagine en position 93 (N93), thréonine en 146 (T146), acide aspartique en 154 (D154), et tryptophane 503 (W503), ont été sélectionnés pour être mutés. Cette sélection a pour base d'une part, la conservation de ces résidus dans la séquence de VP2 de divers parvovirus et d'autre part, leur position stratégique au sein de la protéine de structure (*figures 12 A, B, C et D*). De ce fait, nous nous attendions à ce que l'introduction de ces mutations dans la protéine de structure VP2 altère ou empêche la formation de capsides recombinantes VLPs.

### **XIV. Système baculovirus et particules recombinantes vides (VLPs)**

#### ***XIV.1. Le système baculovirus***

De nombreuses molécules protéiques sont indispensables en diagnostic et en thérapie humaine. L'extraction de ces molécules à partir de leur milieu naturel est peu



**Figure 12 : Positions des acides aminés mutés.**

Ces représentations ont été réalisées en utilisant le programme de visualisation de structures tridimensionnelles « protein explorer ». Chaque couleur représente une sous-unité VP2.

(A) : L'asparagine 93 dans un trimère VP2 est situé à l'intérieur de la VP2.

(B) : La thréonine 146 dans un pentamère est situé autour du canal cylindrique (axe de symétrie 5)

(C) : L'acide aspartique 154 dans un trimère VP2 est situé à la jonction entre les monomères.

(D) : Le tryptophane 503 dans un trimère (1) est situé à la périphérie du trimère et dans deux trimères associés (2) est situé à la jonction entre deux trimères.

La différence des intermédiaires structuraux choisis pour la représentation des acides aminés mutés a pour but de mieux mettre en évidence la position stratégique de chaque résidu.

A



B



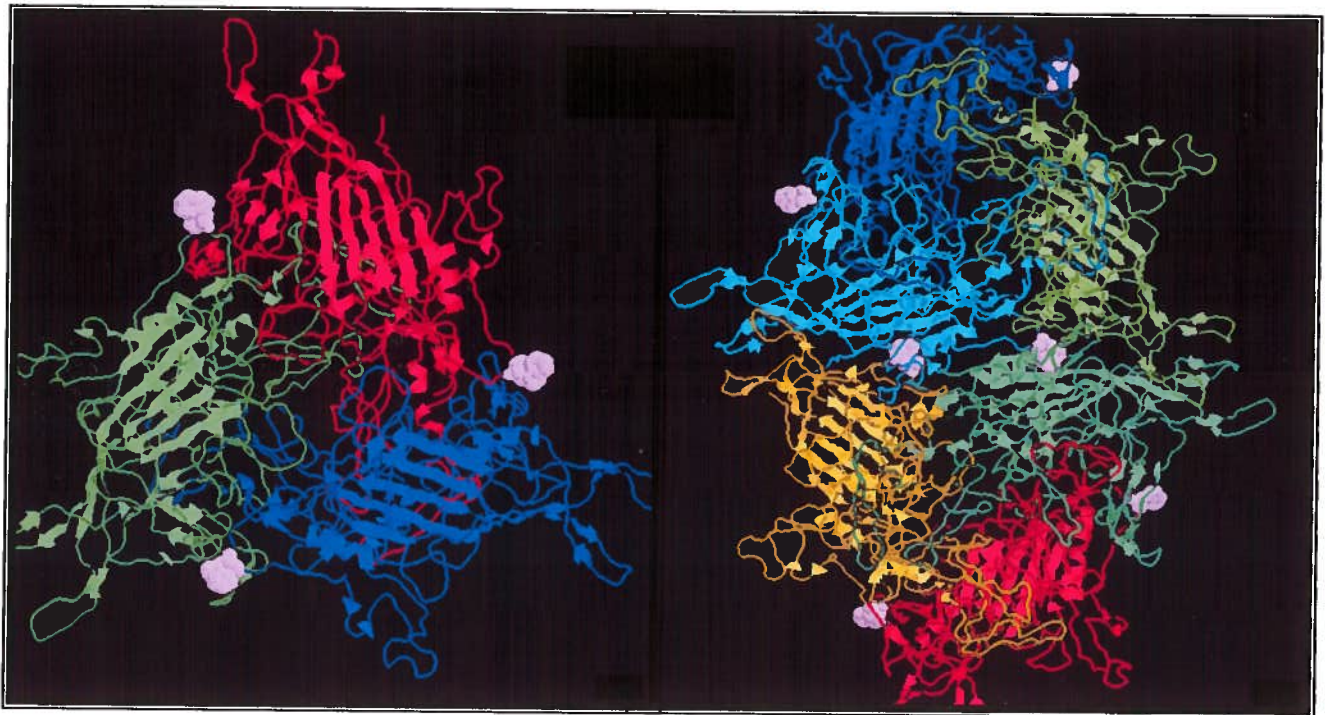
C



D

(1)

(2)



intéressant en terme de quantité, de coût, voire d'éthique. Le développement de systèmes d'expression procaryote et eucaryote a largement affranchi le monde de la recherche, de ces problèmes. En effet, ces systèmes constituent une alternative plus accessible, moins onéreuse et plus commode à utiliser.

Parmi tous ces systèmes, il en existe un, particulièrement performant, basé sur l'expression de protéines recombinantes dans des cellules d'insectes, grace à un vecteur viarl. Il s'agit du système baculovirus. C'est en 1981 que l'idée d'un tel procédé a été évoquée (Miller, 1981). Depuis, son utilisation est très largement répandue et sert à l'expression d'une grande variété de protéines. Ces dernières sont, non seulement, produites en grandes quantités (Luckow and Summers, 1988; Goosen, 1991), mais sont en plus, dans la plus part des cas, biologiquement actives; les modifications post-traductionnelles étant, en général, correctement effectuées lors de leur expression (Cameron and Bishop, 1989). Par ailleurs, les protéines obtenues présentent des propriétés immunologiques et antigéniques similaires à leurs homologues natives (Miller, 1988; Luckow and Summers, 1988).

La production de baculovirus recombinants comprend plusieurs étapes. La première consiste à cloner le gène à exprimer, dans un vecteur de transfert. Une transformation de bactéries type *Escherischia coli* contenant l'ADN du baculovirus dérivé du virus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis (*AcNPV*), permet, par recombinaison, l'insertion du gène d'intérêt dans cet ADN. Après sélection des clones positifs, l'ADN recombinant est ensuite extrait, puis transfecté dans des cellules d'insectes en vue de produire des baculovirus recombinants produisant la protéine voulue.

#### ***XIV.2. Les VLPs***

L'expression de protéines de capsid de certains virus dans le système baculovirus a conduit à la formation de particules virales recombinantes vides (VLPs). Ces virus incluent les poliovirus (Urakawa et al., 1989; ), les rotavirus (Sabara et al., 1991), les picornavirus (Urakawa et al., 1989), les orbivirus (French et al., 1990), les papillomavirus

(Rose et al., 1993), les parvovirus (Brown et al., 1990; Saliki et al., 1992; Martinez et al., 1992; Christensen et al., 1993; Christensen et al., 1994), et bien d'autres.

Les VLPs ont la particularité d'être non pathogènes, puisqu'elles ne contiennent pas de matériel génétique. Leurs propriétés intéressent aussi bien la recherche clinique que fondamentale. En effet, ces particules constituent un excellent substrat pour des tests de diagnostic et pour le développement de vaccins. L'expression de molécules chimériques constituées d'une protéine de capsid virale et d'un peptide, voire d'une protéine entière, dans le système baculovirus, a été étudiée et les résultats obtenus suggèrent que, les VLPs pourraient servir de plate-forme pour la présentation de protéines étrangères. Il s'agit d'une caractéristique extrêmement attractive pour la vaccination, la thérapie génique et la délivrance de molécules thérapeutiques (Casal, 1999; Hoque et al., 1999; Kaufmann et al., 2001; Miyamura et al., 1994). Cette stratégie a également connu une autre application impliquant l'utilisation de la protéine fluorescente verte EGFP (enhanced green fluorescent protein) comme partenaire de fusion des protéines de capsides. Des VLPs fluorescentes (fVLPs) sont alors obtenues (Charpilienne et al., 2001; Gilbert et al., 2004; Gilbert et al., 2005). De telles particules présentent un outil de visualisation permettant d'étudier les événements de l'infection, les propriétés biologiques des virus et de développer des tests de diagnostic simples et faciles, basés sur la fluorescence.

Par ailleurs, les VLPs représentent un modèle de choix pour l'étude de la structure des capsides virales et de leur mécanisme d'assemblage (cf chapitre IV.4.).

Enfin, bien qu'aucune étude n'ait été menée dans ce sens, l'idée de se servir des VLPs comme cibles en vue de produire des anticorps recombinants par la technique du phage display, est attrayante.

## XV. Le phage display

La méthodologie du phage display, développée la première fois en 1985 (Smith, 1985), repose sur la présentation de molécules telles que des peptides aléatoires (Scott et Smith, 1990), des fragments d'anticorps (Fab, Fv ou scFv single chain Fv) (Winter et al., 1994) ou d'autres protéines, à la surface de phages filamenteux.

Les principales étapes de cette technique passent par (1) la sélection des phages recombinants pour leur capacité de liaison à la molécule cible; (2) l'éluion et l'amplification des phages sélectionnés, par infection de bactéries; (3) la sélection, à nouveau, à partir des phages amplifiés en utilisant la même cible; (4) l'analyse des phages obtenus après 3 à 4 tours de sélection-amplification, pour l'activité recherchée (*figure 13*).

### *XV.1. Les phages filamenteux*

Les bactériophages filamenteux représentent l'outil de choix pour la construction des banques aléatoires. Parmi eux, les bactériophages fd, M13 et f1 ont été employés, du fait de leur capacité à infecter les souches d'*Escherichia coli* en s'adsorbant à leur pilis. Ces phages contiennent une protéine d'enveloppe majeure g8p et quatre protéines d'enveloppe mineures : les protéines g3p (responsable de l'adsorption du phage sur les pilis bactériens) et g6p localisées à une extrémité du virion et les protéines g7p et g9p localisées à l'autre extrémité. Toutes ces protéines composent l'enveloppe, laquelle recouvre une molécule d'ADN simple brin circulaire (*figure 14*).

La protéine g3p est habituellement utilisée pour l'expression de molécules à la surface du phage. Le site de clonage se trouve en 5' du gène codant pour cette protéine, donc à l'extrémité N-terminale de celle-ci, afin que la molécule d'intérêt soit tournée vers l'extérieur, donc accessible à une sélection. De plus, une telle position permettrait au motif peptidique d'adopter un repliement indépendant de celui de g3p.

Le génome du phage d'une banque combinatoire, nommé phagemide, porte uniquement l'information génétique nécessaire à l'expression de la protéine g3p

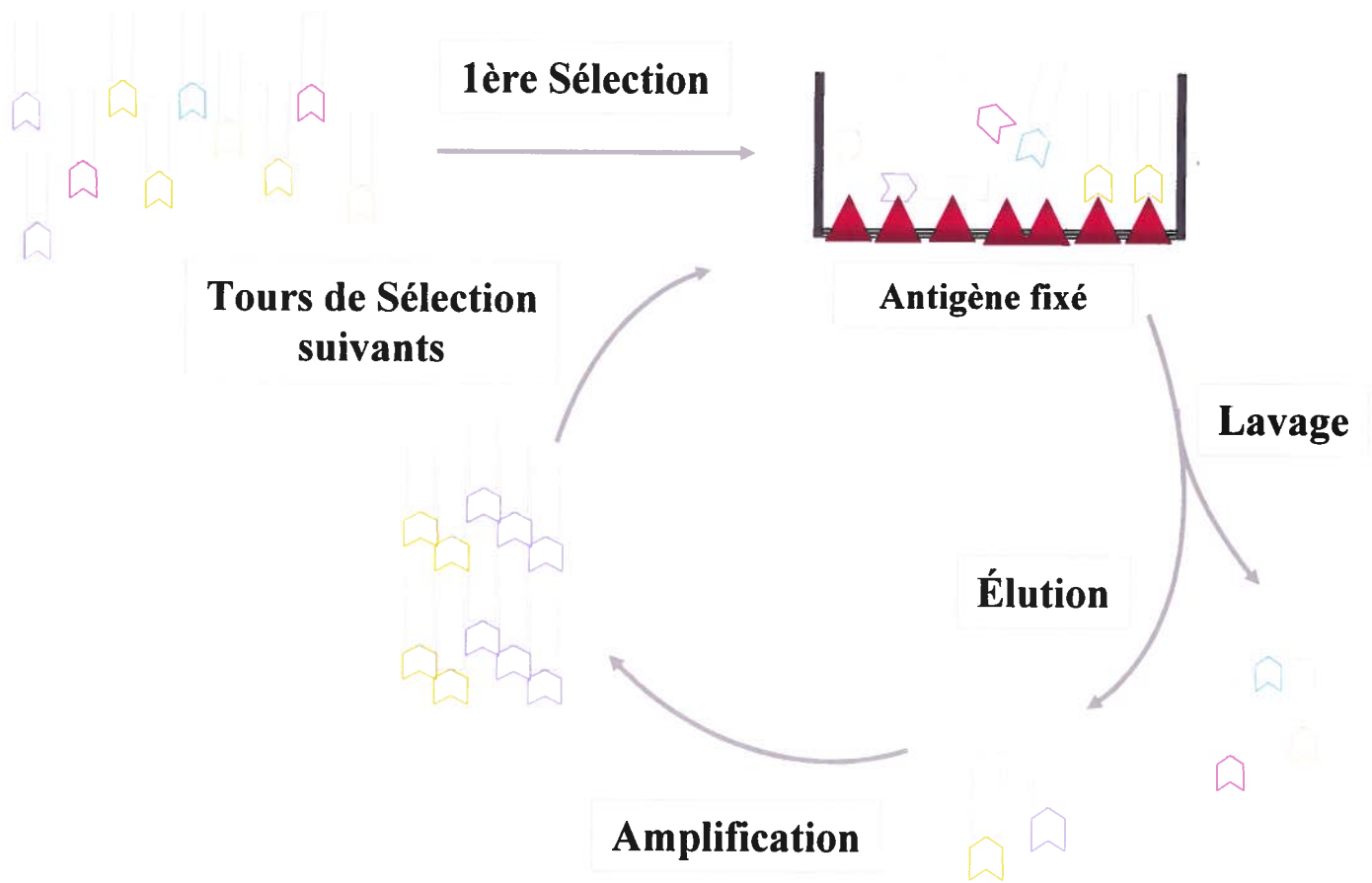
**Figure 13 :** Représentation du processus de sélection de fragments d'anticorps par la technique du "phage display".

Les phages exprimant à leur surface des scFv de spécificités diverses sont produits à partir d'une banque synthétique de phages.

Les phages sont mis en contact avec l'antigène fixé.

Une élution permet de récupérer les phages spécifiques de l'antigène. Ces derniers sont amplifiés, afin de servir pour le tour de sélection suivant.

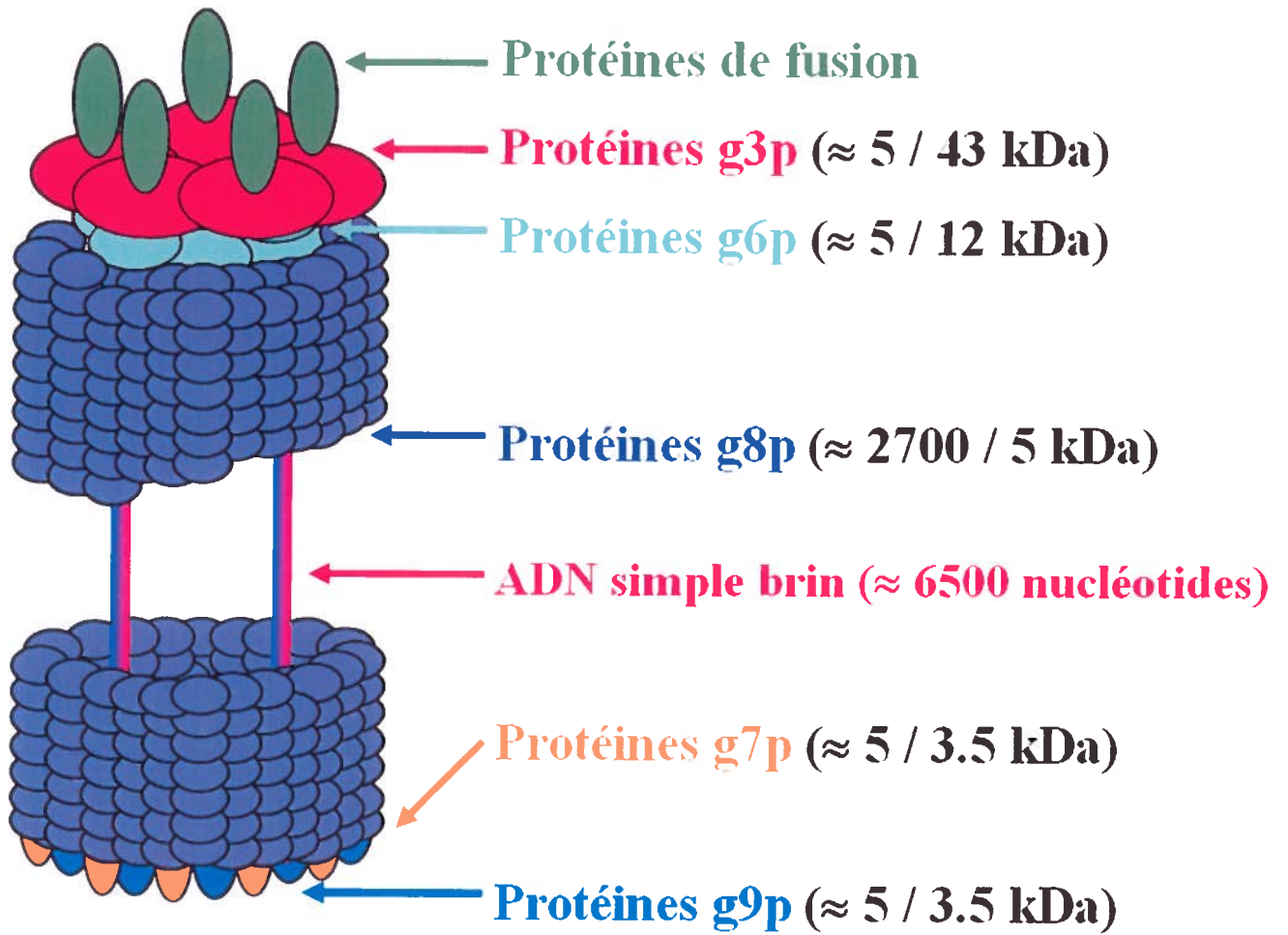
**Banque phage-anticorps**





**Figure 14 :** Structure du bactériophage M13.

Ce phage est le plus utilisé pour la construction de banques de «phages display». Les protéines étrangères (ex : scFv) sont exprimées en fusion avec la protéine g3p (pIII). Le nombre de protéines ainsi que leur poids moléculaire sont indiqués entre parenthèse.



recombinante, ainsi qu'à la réplication du génome. Les autres gènes essentiels à la formation de particules phagiques, sont fournis suite à une co-infection avec un phage auxiliaire (Sidhu, 2001), dont le génome ne se répliquera pas en raison d'une mutation au niveau de son gène *g2*. Cette mutation affecte le rôle d'initiateur de la réplication assuré par le produit de *g2* (la protéine *pII*), en diminuant son affinité pour l'origine de réplication. De ce fait, la prédominance du phagemide par rapport au phage auxiliaire, sera assurée (Vieira et Messing, 1987).

Afin d'éviter une compétition entre une protéine *pIII* recombinante du phagemide et une protéine *pIII* de type sauvage, des équipes ont développé des phages auxiliaires dépourvus du gène *g3* (Rakonjac et al. 1997). Ainsi, à la surface de tous les phages produits, sera exprimée la molécule étrangère.

#### ***XV.2. Les banques combinatoires d'anticorps***

De nombreuses publications parues ces dernières années révèlent la performance de la technologie des phages recombinants pour diverses applications. Une des plus prometteuses est la construction de banques combinatoires (ou aléatoires) de fragments d'anticorps (Winter et al., 1994; Barbas et Burton, 1996; Clackson et al.). Ce type de banques permet de pallier les inconvénients de la production d'anticorps par immunisation d'animaux.

Le principe repose sur la combinaison des domaines variables d'un anticorps, puis leur expression à la surface du phage, soit sous forme de fragments *scFv* dans lesquels des chaînes lourdes (*VH*) et légères ( $V_L = V_{\kappa} + V_{\lambda}$ ) sont liées de manière covalente par un court peptide, soit sous forme de fragments *Fab*; l'objectif étant de générer un répertoire de fragments d'anticorps diversifié. Il existe deux types principaux de banques : les banques combinatoires d'anticorps naturelles qui sont obtenues à partir d'ADNc correspondant aux domaines *VH* et *VL* de lymphocytes B immunisés (banques immunes) ou non immunisés (banques naïves) et les banques combinatoires d'anticorps synthétiques qui sont, quant à elles, construites à partir des différents gènes (*V*, *D*, *J*) dont le réarrangement est réalisé *in vitro* par PCR, ce qui permet l'obtention de structures

inexistantes dans la nature (Hoogenboom et Winter, 1992). Dans les deux types de banques, les séquences VH et VL sont clonées ensemble dans le génome du bactériophage filamenteux en fusion avec son gène codant pour une des protéines de surface.

La production d'anticorps recombinants par la technique du phage display offre l'avantage d'être, dans la majorité des cas, faisable entièrement *in vitro* rendant de ce fait, possible l'utilisation d'antigènes non immunogènes (Williams et Willat, 2002). La gamme d'antigènes cibles en est, par conséquent, considérablement élargie, remédiant ainsi à un des points limitant de la production d'anticorps avec des hybridomes (manque d'immunogénicité des cibles potentielles) (Williams et Willat, 2002). La quantité d'antigène ainsi que le temps, exigés par chacune des deux technologies, constituent des points supplémentaires favorisant le phage display : il faut moins d'antigène et un temps réduit dans le cas du phage display (Williams et Willat, 2002 ; Jostock et al., 2004). De plus, cette technique est peu onéreuse et évite les considérations éthiques liées à l'expérimentation sur les animaux.

### ***XV.3. Applications***

Actuellement, différents scFv font l'objet de tests cliniques en vue de leur utilisation aussi bien en diagnostic qu'en thérapie (Souriau et Hudson, 2003). Ces molécules présentent, en effet, des caractéristiques intéressantes pour leur usage en immunothérapie : contrairement aux anticorps monoclonaux entiers, les scFvs pénètrent facilement dans les cellules tumorales du fait de leur faible poids moléculaires et sont éliminés de la circulation par le rein au bout de quelques heures seulement (Yokota et al., 1992).

Plusieurs antigènes (toxines, molécules oncogéniques, molécules virales...) ont servi de cibles pour générer des anticorps recombinants à partir des banques phage/anticorps (Ridgway et al., 1999 ; Reilly et al., 2001 ; Souriau et al., 2004 ; Monedero et al., 2004; Flego et al., 2005; Williamson et Matthews, 1999). Les résultats d'études visant à produire des scFvs dirigés contre des virus, montrent que les anticorps

recombinants obtenus reconnaissent spécifiquement les protéines virales cibles. Dans la majorité de ces études, ces cibles consistent en des protéines virales recombinantes (Monedero et al., 2004 ; Rodriguez-Diaz et al., 2004 ; Liu et al., 2004 ; Blazek et al., 2004 ; Ray et al., 2001 ), et dans certains cas, en des particules virales entières (Saldarelli et al., 2005 ; Ziegler et al., 1995). L'utilisation de VLPs dans un contexte similaire, s'est limitée à la présentation de peptides produits par phage display, à la surface des VLPs (Shin and Folk, 2003). L'identification et le développement de tels anticorps constituent un moyen pour combattre les infections virales, mais également pour améliorer les méthodes de diagnostic, ainsi que les techniques employées en recherche fondamentale.

L'application de la technologie du phage display sur le B19V serait, par conséquent, intéressante dans la mesure où l'administration d'immunoglobulines humaines polyvalentes s'est révélée être un bon régime curatif dans le cas d'une infection persistante chez les patients souffrant d'immunodéficience (Frickhofen et al., 1990 ; Koduri et al., 1999 ; Kurtzman et al., 1989). Remplacer ce type d'immunoglobulines naturelles par des anticorps recombinants réduirait les coûts et le temps de production et éviterait les risques de contamination.

Par ailleurs, en recherche fondamentale, outre le fait de disposer d'un outil de détection du virus peu onéreux, les scFvs spécifiques des protéines de capsides du B19V pourraient nous offrir la possibilité de mieux connaître les subtilités structurales du virus. Il serait envisageable de développer des anticorps spécifiques distinguant la capsid de ses intermédiaires structuraux, dans le but de suivre et cerner les différentes étapes de formation de la capsid virale.

Le B19V étant difficile à cultiver et à obtenir en grandes quantités, l'utilisation de VLPs présente donc un outil à exploiter pour concrétiser l'idée de produire des anticorps recombinants dirigés contre la capsid virale.

## Objectifs de cette étude

Comprendre le mécanisme de l'assemblage de la capsid du B19V constitue une démarche cruciale pour contrer ce virus. En effet, à long terme, une telle approche permettra d'envisager, entre autre, le développement d'antiviraux qui agiraient à ce stade du cycle viral. De plus, le développement d'anticorps recombinants spécifiques de la capsid virale, à visée technique et même thérapeutique, présente un aspect attrayant, compte tenu de l'onérosité des anticorps disponibles.

À la lumière de ces données, les objectifs ciblés dans ce projet visent :

- Analyser l'importance des résidus conservés de la protéine de structure VP2 du B19V, sur l'assemblage de la capsid du virus.
- Le développement d'anticorps recombinants scFv spécifiques de la protéine de la capsid du B19, VP2.

La concrétisation de ces objectifs s'appuie notamment sur l'utilisation du système baculovirus et du phage display, décrits dans les chapitres XIV et XV, comme support technique.

## ***MÉTHODOLOGIE***

## I. Plasmides, lignées cellulaires et banques de phages

### I.1. Les plasmides

Le vecteur de transfert utilisé pour l'expression de VP2 dans le système baculovirus, est le pFastBac1. Ce dernier, de 4775 paires de bases, porte les gènes de résistance *Gentamycine* et *ampicilline*, utiles à la sélection des clones positifs, le promoteur fort de la polyhédrine du virus *AcNPV* (Pph) et un site de clonage multiple contenant, entre autres, les sites *EcoRI* et *SphI*. Une fois cloné dans ce vecteur, le gène d'intérêt se retrouvera sous le contrôle du promoteur de la polyhédrine Pph, le tout étant flanqué des éléments transposables du transposon Tn7 (Tn7R et Tn7L).

Le clone infectieux pB194244Δ a été employé pour l'expression de VP2 dans les cellules de mammifère. Il est de 8580 paires de bases et contient la totalité du génome du B19, ainsi que le gène de résistance *ampicilline*.

### I.2. Les lignées cellulaires

- Deux lignées de cellules d'insectes ont été employées : *Spodoptera frugiperda* (Sf9) pour l'amplification des stocks de baculovirus recombinants et *Trichopulsia ni* (High-Five) pour l'expression de la protéine. Le milieu de culture de la première est le milieu Sf 900 II SFM (Gibco BRL®) et pour la deuxième, le milieu Express Five SFM (Gibco BRL®) additionné de 10% L-Glutamine 200 mM (Gibco BRL®). Les deux lignées sont cultivées dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> et entretenues en routine en les passant au 1/5<sup>ème</sup> ou au 1/10<sup>ème</sup>, après avoir gratté le tapis cellulaire avec un grattoir et homogénéiser la suspension cellulaire. Le passage à 1/5<sup>ème</sup> donne une confluence après environ 3 jours; le passage à 1/10<sup>ème</sup>, après environ 6 jours.

- La lignée de cellules de COS-7 (dérivées de cellules de rein de singe vert d'Afrique) a également été utilisée pour exprimer la protéine VP2. Les cellules sont cultivées dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> dans du milieu « Dulbecco's Modified Eagle Medium » DMEM (Gibco BRL®) additionné de 1% Pénicilline/Streptomycine (10 U/μl, Gibco BRL®), 1% L-Glutamine 200 mM (Gibco BRL®), et 7% sérum de veau fœtal inactivé (Gibco BRL®). La première étape de l'entretien routinier des cellules consiste à retirer le milieu et à rincer les cellules avec du PBS « Dulbecco's Phosphate-buffered saline » 1X (Gibco BRL®). Celui-ci est ensuite remplacé avec 2 mL de la



trypsine solubilisée dans (Worthington Biochemical Corporation : Trypsine LF500), afin de détacher les cellules de leur support. Après 5 minutes d'incubation, la trypsine est enlevée et les cellules sont mécaniquement individualisées dans 6 mL de milieu, puis diluées dans un nouveau flasque du milieu neuf.

### ***1.3. La banque de phages***

Les banques des phages utilisées dans ce projet porte le nom de Tomlinson I et J. Chacune comprend plus de 100 millions de fragments de scFv différents, clonés dans un phagemide portant un gène de résistance à l'ampicilline et inséré dans *E.coli* TG1.

Les fragments scFv comportent un polypeptide unique renfermant les domaines  $V_H$  et  $V_L$ , reliés l'un à l'autre par un linker flexible glycine-serine. Un codon *ambre* a été inséré entre la séquence codant pour la protéine g3p et celle codant pour les scFvs. De ce fait, l'infection d'une souche suppressive d'*E.coli* TG1 avec les phages sélectionnés, produit des phages portant la protéine de fusion scFv-g3p; le codon *ambre* étant traduit en glutamine des ces bactéries. L'obtention de scFvs est possible en infectant une souche non-suppressive d'*E.coli* HB2151 qui reconnaît le codon *ambre* (TAG) comme un codon stop. Enfin, les scFvs sont capables de se lier aux protéines A et L, ce qui rend possible leur purification ou leur détection en utilisant ces deux moyens.

## **II. Techniques de biologie moléculaire**

### ***II.1. Clonage du gène VP2 dans le vecteur pFastBac1***

#### ***II.1.1. Amplification PCR***

Le clone infectieux pB19-4244, différent du pB194244 $\Delta$  seulement par la présence d'un site de restriction *XbaI*, a servi de matrice pour l'amplification du gène VP2. Pour ce faire, un couple d'amorces, B19-3305 et B19-4968 représentées dans le **tableau 2**, a été utilisé.

Le mélange réactionnel, d'un volume final de 50  $\mu$ l par réaction, contient 5  $\mu$ l de tampon 10X (Native Plus pfu Buffer, Stratagene), 1  $\mu$ l de 10 mM de dNTP, 1  $\mu$ l de chacune des amorces sens et anti-sens (50 pmoles) et 0.5  $\mu$ l de pB19-4244 (0.18  $\mu$ g/ $\mu$ l).

**Tableau 2** : Séquences des oligonucléotides ayant servies à l'amplification du gène VP2 et son séquençage, une fois cloné dans le vecteur pFastBac1.

<b>Construction</b>	<b>Objectif</b>	<b>Amorces</b>	<b>Séquence</b>
pFastBac1 /VP2	Amplification (PCR)	B19-3305	CG <b>GAATTC</b> ACCATGACTTCAGTTAATTCTGC <i>EcoRI</i>
		B19-4968	CGCAGTACT <b>GCATGCTT</b> ACAATGGGTGCACACGGC <i>SphI</i>
pFastBac1 /VP2	Séquençage	Fast-F	CTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACG
		Fast-R	CTACAAATGTGGTATGGCTG

La Pfu DNA polymérase a été ajoutée en dernier à raison de 2.5 unités. Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur selon le programme suivant : une minute à 95°C, suivie de 35 cycles de 40 secondes à 95 °C, 30 secondes à 55°C, 2 minutes et 30 secondes à 72°C, puis une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Les échantillons ont été conservés à +4°C.

### *II.1.2. Digestion*

Une digestion du vecteur pFastBac1, ainsi que du produit de PCR, VP2, a été réalisée avec les enzymes correspondantes (*tableau 2*). Les mélanges réactionnels sont d'un volume de 20 µl chacun et contiennent 1 µg d'ADN, 2 µl de tampon One-phor-All et 0.5 µl de chaque enzyme, dans le cas du vecteur et 18 µl du produit de PCR auxquels sont ajoutés 1 µl de chaque enzyme de restriction, pour l'insert. Après agitation, les mélanges ont été incubés à 37°C pendant 1 heure, puis purifiés par phénol/chloroforme et resuspendus dans de l'H<sub>2</sub>O. Les ADN ont été conservés à -20°C.

### *II.1.3. Ligation*

La ligation entre le vecteur et l'insert se fait dans un volume final de 10 µl, avec un ratio vecteur/insert de 1/3 et en présence d'1 µl de ligase (NEB : T4 DNA ligase 1u/µl) et 1 µl de tampon de ligation 10X (NEB : Buffer for T4 DNA Ligase). Après agitation, le mélange réactionnel a été incubé toute la nuit à la température de la pièce.

### *II.1.4. Analyse sur gel d'agarose*

Les produits résultant des étapes «PCR » et «digestion» ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Ce dernier a été préparé dans un tampon TAE (40 mM Tris acétate pH 7.8, 2 mM acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA)).

Les échantillons, additionnés du tampon de chargement (0.25% de bleu de bromophénol, 0.25% de xylène cyanol FF, 30% de glycérol), ont été déposés sur gel puis visualisés sous ultra-violets (UV) après incubation du gel dans du bromure d'éthidium (0.5 µg/µl) pendant 15 minutes. Un marqueur poids moléculaire, déposé sur le même gel, permet une estimation de la taille des fragments.

## ***II.2. Préparation des bactéries électrocompétentes***

Les bactéries *E.coli* XL1-Blue sont cultivées pendant 16 h en présence de tétracycline. Cinq cents millilitres de milieu de culture SOB sontensemencés avec 5 ml de la culture de XL1-Blue en phase stationnaire, et placés à 37°C jusqu'à obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,6. Les bactéries sont alors rapidement transférées sur glace, centrifugées (5000 g, 10 min à +4°C) et remises en suspension dans 200 ml d'eau distillée réfrigérée. Cette opération est renouvelée deux fois. Après la dernière centrifugation, le culot bactérien est remis en suspension dans 2 ml d'eau distillée en présence de 10% de glycérol. Les bactéries sont aliquotées sous un volume de 105 µl et immédiatement congelées à -80°C.

## ***II.3. Sélection des clones positifs***

### ***II.3.1. Transformation bactérienne***

L'électroporation de 50 µl de bactéries *E.coli* XL1-Blue avec 1 µl du produit de ligation est réalisée dans une cuve de 0.1 cm (BTX disponible cuvettes, 1mm) à 1.8 kV à l'aide d'un électroporateur (BTX ECM® 395 Electroporation System). La préparation du mélange se fait dans la glace et en milieu stérile.

Le contenu de la cuve est ensuite étalé sur une boîte de gélose (LB-agar) contenant 100 µg/ml d'ampicilline, puis incubé à 37°C pendant la nuit. L'ampicilline permet la sélection des clones positifs. Vingt quatre clones sont sélectionnés, mis en culture dans 2 ml de milieu liquide LB contenant 100 µg/ml et soumis à une mini-préparation.

### ***II.3.2. Purification de l'ADN plasmidique par « Mini-préparation »***

Cette méthode permet d'extraire l'ADN plasmidique des clones sélectionnés, afin de vérifier la présence ou non de l'insert.

Un volume de 200 µl de culture bactérienne de chaque clone est déposé dans un tube Eppendorf de 1.5 mL contenant 200 µl de la solution II (1% SDS, 0.2 N NaOH). Après inversions des tubes jusqu'à homogénéisation du mélange, un volume de 200 µl de la solution III (acétate de potassium 5 M, 11.5% d'acide acétique glacial) sont ajoutés. Les

tubes sont, à nouveau, mélangés par inversion, puis incubés dans la glace pendant 10 minutes. Une centrifugation à 18000g pendant 3 minutes, est ensuite réalisée et le surnageant obtenu est transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 1.5 mL contenant 400 µl d'isopropanol. Le tout est mélangé par inversion, puis centrifugé à 21000g pendant 3 minutes. Une dernière centrifugation à 21000 g pendant 1 minute se fait en présence de 500 µl d'éthanol. Après élimination de ce dernier, les culots sont séchés pendant 10 minutes au speed-vacuum, puis dissout dans 40 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH8, 1 mM EDTA) contenant 10 µg/mL de RNase.

La vérification de la présence ou non de l'insert se fait par digestion de chaque clone avec les enzymes correspondantes (*tableau 2*), tel que décrit dans la section II.1.2. Le vecteur pFastBac1 digéré avec les mêmes enzymes de restriction sert de témoin négatif. Les profils de digestion sont vérifiés sur gel d'agarose en déposant 10 µl de chaque produit de digestion et en présence d'un marqueur de poids moléculaire d'ADN.

L'intégrité des clones est confirmée par séquençage (les amorces utilisées sont indiquées dans le *tableau 2*) d'un des clones positifs (pFastBac1/VP2), donc contenant l'insert, ce dernier est remis en culture dans un volume de 40 mL de milieu LB contenant 100 µg/ml et incubés à 37°C pendant 16 heure, en vu de conserver à -80°C, 2 mL de la culture bactérienne en présence de 15% de glycérol et de faire une midi-préparation avec le reste de la culture (38 mL).

### *II.3.3. Midi-préparation*

Les trente huit millilitres de culture bactérienne sont répartis dans deux tubes adaptés au rotor SS34, puis une centrifugation à 6000g pendant 5 minutes est réalisée. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 4 mL de la solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, autoclavé). Un volume similaire (4 mL) de la solution II (voir section II.3.2.) est ensuite ajouté et le mélange est homogénéisé par inversion. Enfin, la solution III (voir section II.3.2.) est ajoutée à raison de 4mL également. Après avoir mélangé le contenu des tubes par inversion, ces derniers sont incubés dans la glace pendant 15 minutes, puis centrifugés à 5000 g pendant 20 minutes.

Les surnageants obtenus sont réunis dans un nouveau contenant 6 mL d'isopropanol. Après un mélange par inversion le tube, une centrifugation à 15000 g pendant 15 minutes est réalisée. Le surnageant est éliminé et le culot est centrifugé à nouveau à 15000g pendant 5 minutes dans 1 mL d'éthanol 70%, puis séché avant d'être dissout dans 200 µl d'H<sub>2</sub>O contenant 10 µg/mL de RNase et laissé à température pièce pendant 30 minutes.

## ***II.4. Purification de l'ADN***

### ***II.4.1. Avec le Kit Miniprep Express Matrix***

Les vecteurs pFastBac1 recombinants sont purifiés en utilisant la solution Miniprep Express Matrix.

Un volume de 400 µl de cette dernière est ajouté à l'ADN. Le tout est mélangé au vortex puis laissé à la température de la pièce pendant 5 minutes. Le mélange est centrifugé à 14000 g pendant 2 minutes. Le culot est ensuite dissout dans 500 µl d'éthanol 80%, puis centrifugé à nouveau à 14000 g pendant 2 minutes. Le surnageant est jeté et une autre centrifugation permet d'éliminer le restant d'éthanol. Le culot est séché au speed-vacuum pendant 10 minutes, puis resuspendu dans 75 µl d'H<sub>2</sub>O, afin d'éluer l'ADN. Une dernière centrifugation à 14000 g pendant 2 minutes, permet de récupérer le surnageant contenant l'ADN.

### ***II.4.2. Avec le Kit Qiagen***

La purification des clones infectieux est effectuée à l'aide de colonnes fournies dans la trousse « Midi Prep » de Qiagen. Les étapes de la midi-préparation sont arrêtées à la centrifugation du mélange composé du culot bactérien et des différentes solutions. Les colonnes sont équilibrées avec 4 mL du tampon équilibrant (solution QBT fournie par Qiagen; 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15% isopropanol, 0.15% Triton<sup>®</sup> X-100). Après passage total de la solution équilibrante, le surnageant obtenu après centrifugation est ajouté à la colonne. Suite à l'écoulement total du le surnageant, la colonne est lavée deux fois avec 10 ml de solution de lavage (solution QC fournie par Qiagen; 1.0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7.0, 15 % isopropanol). Enfin, dès que la colonne est vide, 5 ml de solution d'élution (solution QF fournie par Qiagen; 1.25 M NaCl, 50mM Tris-Cl, pH 8.5, 15 % isopropanol) sont ajoutés. La précipitation de l'ADN est réalisée en ajoutant 5 mL

d'isopropanol et en centrifugeant à 15000 g pendant 15 minutes. Un volume de 2 mL d'éthanol 70% est ajouté au culot d'ADN. Après une centrifugation à 15000g pendant 5 minutes, le culot est séché puis resuspendu dans 250 µl d'H<sub>2</sub>O.

### ***II.5. Création des mutations***

Les mutations réalisées dans la protéine VP2 consistent à substituer, séparément, quatre de ses résidus (l'asparagine en position 93 (N93), la thréonine en 146 (T146), l'acide aspartique en 154 (D154), et le tryptophane 503 (W503). Pour ce faire, une mutagenèse dirigée, par la technique de mutagenèse dirigée QuickChange (Stratagene), a été réalisée sur les sites du gène VP2, correspondant aux résidus à substituer, en utilisant des amorces appropriées (**Tableau 3**). Ces dernières renferment la mutation désirée, et donc aboutissant au résidu alanine, à leur centre.

Pour chaque mutation, un mélange contenant 5 µl de tampon spécifique de la Pfu (Stratagene : Pfu DNA polymerase buffer 10X) à une concentration finale 1X, 1 µl de 10 mM de dNTP, 1 µl de chacune des amorces sens et anti-sens appropriées (10 pmoles), 40 µl d'H<sub>2</sub>O, 1 µl du vecteur recombinant et 1 µl de la polymérase Pfu (Stratagene : Pfu DNA polymerase 2.5 u/µl), est préparé. Le programme de la réaction d'amplification est le suivant : cinq minutes à 95°C, suivies de 18 cycles de 30 secondes à 95 °C, une minute à 55°C, 12 minutes à 68°C.

Un volume de 35 µl de chaque produit de PCR est soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *DpnI*. La réaction est réalisée dans un volume final de 50 µl, en présence de 4.5 µl du tampon one-phore-all et 20 unités de *DpnI*. Les mélanges réactionnels sont incubés à 37°C pendant une heure. L'enzyme *DpnI* permet l'élimination du vecteur matrice grâce à sa sensibilité à la méthylation de l'ADN. L'ADN néo-synthétisé n'étant pas méthylé, ne sera pas digéré. Le volume restant des produits de PCR sert de témoin, afin de vérifier un éventuel effet indésirable, de *DpnI*. Les profils sont analysés sur gel d'agarose.



**Tableau 3** : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la création des mutations dans le vecteur recombinant pFastBac1/VP2.

**Création des mutations**

<b>Construction</b>	<b>Amorces</b>	<b>Séquence</b>
pFastBac1/VP2D	B19D381-5	GCCTATGCATGTTAGTAGCCCATGAATACAAGTACC
	B19D381-3	GGTACTTGTATTCATGGCTACTAACATGCATAGGC
pFastBac1/VP2N	B19N320-5	CCATGGAGATATTTAGATTTTGCTGCTTTAACTTATTTTTTCA
	B19N320-3	TGAAAAAATAAGTTTAAAGCAGCAAATCTAAATATCTCCATG G
pFastBac1/VP2T	B19T373-5	GGTACTGACAGCACTGCAGGGCGCCTATGCATG
	B19T373-3	CATGCATAGGCGCCCTGCAGTGCTGTCAGTAACC
pFastBac1/VP2 W	B19W730-5	GTAAAGCTACGGGACGGCGAATCCTCAACCTGGAG
	B19W730-3	CTCCAGGTTGAGGATTCGCCGTCCCGTAGCTTTAC

Après une transformation, tel que précédemment décrit, de bactéries *E.coli* XL1-Blue avec les différentes constructions (pFastBac1/VP2D, pFastBac1/VP2N, pFastBac1/VP2T et pFastBac1/VP2W), cinq clones par mutant sont sélectionnés, purifiés puis séquencés (les amorces utilisées sont indiquées dans le *tableau 4*), en vu de vérifier la présence des mutations. Un clone positif par mutant, est purifié avec la même méthode de purification détaillée antérieurement.

## ***II.6. Clonage du gène VP2 dans le clone infectieux***

### ***II.6.1. Obtention des inserts***

Chaque vecteur recombinant muté obtenu dans la partie précédente est digéré avec les enzymes de restriction *Bst*XI et *Xba*I, afin d'isoler la part du gène VP2 renfermant la mutation :

- Pour chaque clone, un volume réactionnel de 40 µl est préparé en mélangeant environ 4 µg d'ADN, 4 µl de tampon 3 10X (New England Biolabs), 0.5 µl de *Bst*XI, le tout complété avec de l'H<sub>2</sub>O. Après une incubation à 55°C pendant 1 heure, les ADN sont précipités avec 40 µl d'isopropanol en centrifugeant pendant 5 minutes à 15000g, et lavés à l'éthanol 70% en centrifugeant de nouveau à la même vitesse pendant 2 minutes. Les culots sont séchés à l'air libre puis resuspendus dans 15 µl d'H<sub>2</sub>O.
- La digestion avec *Xba*I se fait dans un volume final de 20 µl contenant, pour chaque cas, 12 µl du produit de digestion précédent, 2 µl de tampon numéro 3 10X (New England Biolabs), 0.5 µl de *Xba*I, le tout complété avec de l'H<sub>2</sub>O et incubé à 37°C pendant 1 heure.

Chaque produit de digestion obtenu est déposé sur gel d'agarose 0.8% et la bande d'intérêt correspondant à la partie de VP2 contenant la mutation, est découpée. Le fragment d'intérêt est ensuite purifié par la méthode décrite précédemment, à l'exception qu'après ajout de la solution Miniprep Express Matrix, les échantillons sont incubés à 50°C pendant environ 10 minutes en mélangeant toutes les 2 minutes, dans le but de faire fondre l'agarose.

**Tableau 4** : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la vérification de la présence des mutations dans les vecteurs recombinants pFastBac1/VP2.

<b>Séquençage des mutants pFastBac1/VP2</b>		
<b>Construction</b>	<b>Amorces</b>	<b>Séquence</b>
pFastBac1/VP2D	B19N320-5	CCATGGAGATATTTAGATTTTGCTGCTTTAAACTTATTTTTTCA
pFastBac1/VP2N	Fast-F	CTATAGTTCTAGTGGTTGGCTACG
pFastBac1/VP2T		
pFastBac1/VP2W	Fast-R	CTACAAATGTGGTATGGCTG

### *II.6.2. Digestion du clone infectieux*

Une quantité d'environ 10 µg de B194244Δ, additionnée de 4 µl de tampon one-phore-all 10X, 3 µl d'enzyme *XbaI*, le tout complété à 40 µl avec de l'H<sub>2</sub>O, est incubée à 37°C pendant 1 heure.

La digestion du produit obtenu avec *BstXI* se fait simplement en ajoutant au mélange réactionnel 3 µl de l'enzyme et en l'incubant à 55°C pendant 30 minutes. Cette durée d'incubation a été définie après avoir testé différents temps (20, 30, 40 et 60 minutes). Le but était de parvenir à un profil de digestion offrant la bande d'intérêt et dans une proportion suffisante. En effet, le site de restriction *BstXI* étant présent deux fois dans le clone infectieux (un site situé dans le gène VP2, en amont du site *XbaI*; et un autre au niveau du vecteur, en aval de *XbaI*), trois bandes pouvaient être obtenues et visualisées sur gel d'agarose dans des quantités variant selon le temps de digestion : une bande à environ 7400 pb correspondant au B194244Δ digéré à extrémités 5' *BstXI*-3' *XbaI*, une deuxième à environ 7200 pb correspondant au B194244Δ digéré à extrémités 5' *XbaI*-3' *BstXI*, et une troisième à 6000 pb qui correspond au B194244Δ digéré à extrémités 5' *BstXI*-3' *BstXI*. La seconde bande étant celle qui nous intéresse, étant donné qu'elle respecte l'orientation et la complémentarité des extrémités avec les inserts, est découpée et l'ADN qu'elle renferme, purifié tel que décrit auparavant.

Les étapes de ligation entre le vecteur et chaque insert contenant la mutation, de sélection de clones positifs, de purification suivie de séquençage (les amorces utilisées sont indiquées dans le *tableau 5*) et de midi-préparations des stocks d'ADN, sont réalisées de la même façon que décrit précédemment, à l'exception que les transformations se font dans la souche bactérienne *E.coli* SURE.

## **III. Expression de VLPs dans le système baculovirus**

### *III.1. Production des bacmides recombinants*

#### *III.1.1. Transformation de bactéries DH10Bac*

Les vecteurs recombinants pFastBac1, contenant ou non une mutation au niveau de l'insert, ont servi à la transformation de la souche bactérienne d'*E.coli*, DH10Bac qui

**Tableau 5** : Séquences des oligonucléotides utilisés pour la vérification de la présence des mutations dans les vecteurs recombinants B19/VP2.

<b>Séquençage des mutants B19/VP2</b>		
<b>Construction</b>	<b>Amorces</b>	<b>Séquence</b>
B19/VP2D	B19N320-5	CCATGGAGATATTTAGATTTTGCTGCTTTAAACTTATTTTTTTCA
B19/VP2N	B19D381-3	TGAAAAAATAAGTTTAAAGCAGCAAATCTAAATATCTCCATGG
B19/VP2T	B19N320-5	CCATGGAGATATTTAGATTTTGCTGCTTTAAACTTATTTTTTTCA
B19/VP2W	B194968-3	CGCAGTACTTCTAGATTACAATGGGTGCACACGGC



contient le Bacmide, ainsi qu'un plasmide auxiliaire. Ce dernier fournit les éléments nécessaires à la transposition tout en conférant à la bactérie la résistance à la tétracycline. Le bacmide contient le génome d'un baculovirus modifié dans lequel sont insérés à la place du gène de la polyhédrine une origine de réplication mini-F, un marqueur de résistance à la kanamycine, et les sites receveurs du transposon Tn7 inséré dans la sous unité  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase. Lorsque la transposition de l'élément mini-Tn7 a lieu dans le bacmide, la phase de lecture de la sous-unité  $\alpha$  n'est plus conservée. La sélection des bactéries blanches permet, donc, d'obtenir le bacmide recombinant possédant le gène d'intérêt (*figure 15*).

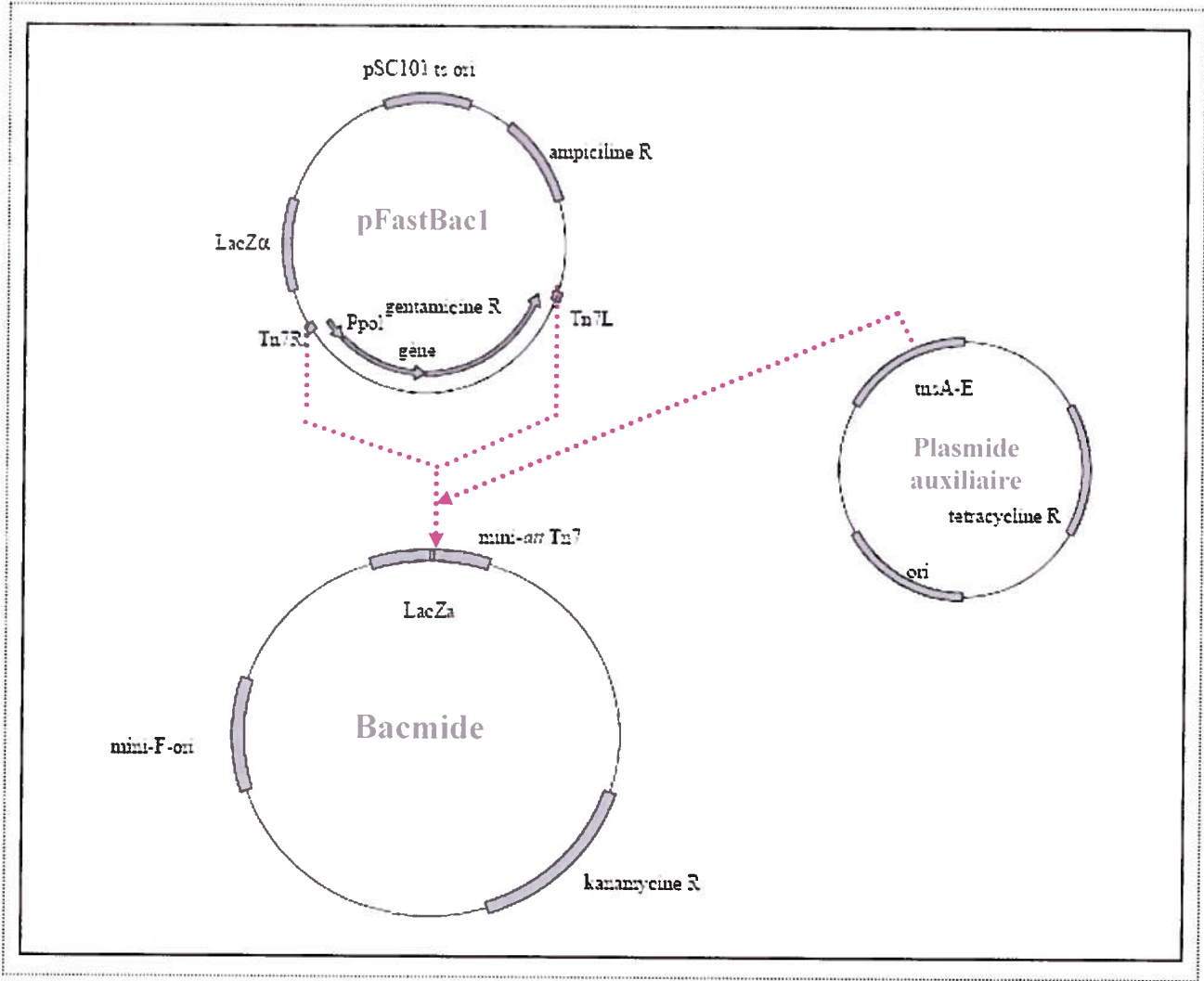
La transposition est effectuée en transformant 100  $\mu$ l de bactéries DH10Bac par 1 ng de plasmide pFastBac1 recombinant. Après transformation par choc thermique (30 min à 4°C et 45 secondes à 42°C puis 2 min à 4°C), la suspension bactérienne est mise en culture pendant 4 heures à 30°C après ajout de 900  $\mu$ l de milieu S.O.C.. Cette culture est diluée au 1/10 jusqu'au 1/10000. Cent micro-litres de ces différentes dilutions sont étalés sur boîte de Pétri contenant du milieu LB additionné de kanamycine (50  $\mu$ g/ml), de gentamicine (7  $\mu$ g/ml), de tétracycline (10  $\mu$ g/ml), de substrat Bluo-gal (100  $\mu$ g/ml) et de l'inducteur IPTG (40  $\mu$ g/ml). Les boîtes sont incubées à 37°C pendant au moins 24 heures. Dans les colonies blanches, la transposition de l'élément mini-Tn7 s'est effectuée dans les sites receveurs du bacmide. Les géloses contenant des colonies blanches isolées, ont été conservées à +4°C.

### *III.1.2. Extraction et purification du bacmide recombinant*

Dix colonies blanches sont amplifiées, chacune dans 2 mL de milieu LB additionné de kanamycine (50  $\mu$ g/ml), de gentamicine (7  $\mu$ g/ml), de tétracycline (10  $\mu$ g/ml), à 37°C en agitation pendant 16 heures. La culture bactérienne de chaque clone est déposée dans un tube de 2 mL, puis centrifugée à 14000g pendant 1 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 300  $\mu$ l de la solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, autoclavé). Par la suite, 300  $\mu$ l de la solution II (1% SDS, 0.2 N NaOH), puis 300  $\mu$ l de la solution III (acétate de potassium 5 M, 11.5% d'acide acétique glacial) sont ajoutés, avec une homogénéisation par inversion des tubes, entre les deux étapes.

**Figure 15 :** Représentation de la transposition du gène d'intérêt (VP2) du vecteur pFastBac1 dans le bacmide du baculovirus, à l'aide du vecteur auxiliaire.

La transposition a lieu entre les éléments mini-Tn7 du vecteur donneur pFastBac1 et les sites d'attachement mini-attTn7 du bacmide. Les éléments nécessaires à ce processus sont fournis par le plasmide auxiliaire. La transposition interrompt l'expression du gène LacZa, ce qui permet la sélection des clones positifs contenant le bacmide recombinant.



Les tubes sont, à nouveau, mélangés par inversion, puis incubés dans la glace pendant 10 minutes. Une centrifugation à 14000g pendant 10 minutes, est ensuite réalisée et le surnageant obtenu est transféré dans un nouveau tube Eppendorf de 1.5 mL contenant 800 µl d'isopropanol. Le tout est mélangé par inversion, puis centrifugé à 14000g pendant 15 minutes. Une dernière centrifugation à 14000 g pendant 5 minute se fait en présence de 500 µl d'éthanol. Après élimination de ce dernier, les culots sont séchés à l'air libre pendant 10 minutes, puis dissous dans 40 µl de TE (10 mM Tris-HCl, pH8, 1 mM EDTA) contenant 10 µg/mL de RNase. La présence de l'insert est vérifiée par PCR avec les amorces spécifiques du gène VP2 et utilisées pour son amplification. Un micro-litre de chaque clone est mis en présence de 1 µl de 10 mM de dNTP, 1 µl de chacune des amorces sens et anti-sens appropriées (10 pmoles), 5 µl de tampon spécifique de l'ADN polymérase Taq (Labquip, 10X) à une concentration finale 1X et 0.2 µl de l'ADN polymérase Taq (Labquip, 5 U/ µl). Les conditions de la réaction de PCR sont similaires à celles utilisées pour l'amplification du gène VP2. Une analyse des produits de PCR sur gel d'agarose permet d'affirmer la présence de l'insert.

Cinq clones positifs (un contenant le gène VP2 sauvage et les quatre autres correspondent aux différentes mutations) sont choisis et les bacmides recombinants leur correspondant sont produits en quantité suffisante, et extraits par les techniques de midi-préparation et de purification plasmidique décrites précédemment.

### ***III.2. Production des baculovirus recombinants***

Les baculovirus recombinants sont produits en transfectant des cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera Frugiperda*) par le bacmide recombinant.

#### ***III.2.1. Transfection des cellules Sf9***

Dans chaque puit d'une plaque de 6 puits, sont déposées environ  $1.5 \times 10^6$  cellules Sf9 contenues dans 2 mL de milieu de culture SF-900 II SFM additionné des antibiotiques pénicilline/streptomycine (50 unités/mL de pénicilline et 50 µg/mL de streptomycine). Les cellules sont incubées à 27°C pendant 1 heure. Cette étape est toujours réalisée lors de la préparation des cellules, afin de permettre leur adhésion à la surface de leur support.

Pour la transfection, un volume contenant 5 µg de chaque bacmide recombinant, a été mélangé à 10 µl du concentré lipidique DOTAP (Roche), puis le volume du mélange a été complété à 150 µl avec du milieu de culture SF-900 II SFM. Le tout est mélangé délicatement à la pipette et ensuite réparti dans un puits d'une plaque 6 puits (P6) contenant  $1.5 \cdot 10^6$  cellules Sf9 dans 2 mL de milieu de culture. Après une nuit d'incubation à 27°C, le mélange de transfection est remplacé par 3 ml de milieu de culture frais et l'incubation est poursuivie jusqu'à 5 jours. Le surnageant obtenu de chaque culture correspond au stock viral P1 qui ne contient qu'une faible quantité de virus. Un deuxième puis un troisième passage par infection des cellules Sf9 dans des volumes plus importants, permettent d'amplifier le stock P1.

### *III.2.2. Amplification du stock viral*

L'amplification de chaque stock viral P1 est réalisée par infection de  $3 \cdot 10^6$  cellules Sf9 contenues dans 5 mL de milieu de culture en flacon de 25 cm<sup>2</sup>, avec 200 µl de P1. Après une incubation de 6 jours à 27°C, le surnageant est récupéré et clarifié par centrifugation à 500 g pendant 10 minutes. Il constitue le stock P2.

Un troisième passage d'amplification est effectué de la même façon que le deuxième, à l'exception que les cellules Sf9 sont au nombre de  $7.5 \cdot 10^6$  contenues dans un volume de 6 mL de milieu en flacon 75 cm<sup>2</sup>, que l'infection est réalisée avec 2mL de P2 et qu'après 1 heure d'incubation à 27°C, le volume dans chaque boîte est complété à 15 mL avec du milieu neuf. Les nouveaux stocks obtenus sont désignés par P3 et sont utilisés dans les expériences d'expression, après leur titrage.

Les inoculums viraux issus de la transfection et de la première amplification sont stockés à -80°C et sont utilisés uniquement pour la production de nouveaux inoculums.

### *III.3. Titrage des virus recombinants*

Les stocks P3 sont titrés à l'aide de la technique de « Reed et Muench » (1938). Deux plaques de 96 puits (P96) ont été inoculées avec 100 µl d'une suspension de  $3 \cdot 10^4$  cellules Sf9 par puits. Les cellules sont incubées pendant une heure à la température de la

pièce, afin de permettre leur adhésion. Des dilutions au 1/10ème (de  $10^{-2}$  à  $10^{-9}$ ), sont préparées à partir de chaque stock viral. Un volume de 100  $\mu$ l de chaque dilution est déposé dans le puits lui correspondant. Après 5 jours d'infection, les cellules sont analysées au microscope optique, afin de rechercher les symptômes d'infection.

### ***III.4. Expression des protéines dans les cellules High-Five***

#### ***III.4.1. Vérification de l'expression de VP***

Afin de vérifier l'expression de la protéine d'intérêt VP2, environ  $1.5 \times 10^6$  cellules SF9 contenues dans 2 mL de milieu de culture sont infectées avec 100  $\mu$ l du stock P2, puis incubées à 27°C pendant 72 heures. Les cellules et le surnageant, sont récupérés après grattage et centrifugés à 500 g pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot contenant les cellules est resuspendu dans 400  $\mu$ l de tampon de lyse 1X (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS). L'analyse des échantillons par électrophorèse immunobuvardage de type Western, permet de vérifier la présence de la protéine VP2.

#### ***III.4.2. Production de VP2***

Cette étape permet de réaliser une mini-production de la protéine VP2 et consiste à infecter des cellules High-Five avec les différentes banques virales recombinantes P3 titrés, à un MOI (indice de multiplicité ou nombre de virus par cellule) de 2. Des boîtes de 125 cm<sup>2</sup> inoculées avec une suspension de  $15 \times 10^6$  cellules High-five contenues dans un volume de 10 mL de milieu de culture, sont préparées. L'infection est réalisée avec des volumes déterminés selon le titre du stock viral, de la façon suivante :

$$V = \frac{\text{Nombre de cellules} \times \text{MOI}}{\text{Titre virus}} \quad \text{mL}$$

Les cellules sont incubées pendant 1 heure à 27°C, avant d'ajuster le volume à 24 mL avec du milieu frais. Après une incubation de 6 jours à 27°C, le surnageant est récupéré et clarifié par centrifugation à 1000 rpm pendant 10 à 15 minutes.

### ***III.5. Purification des protéines à partir du surnageant***

Les protéines ont été purifiées par précipitation au sulfate d'ammonium. Afin d'optimiser la purification, des concentrations croissantes (10, 20, 30 et 40%) en sulfate

d'ammonium ont été testées. Le meilleur rendement a été obtenu avec une concentration de 40%.

Sous agitation magnétique douce et à 0°C, le sulfate d'ammonium est ajouté progressivement au surnageant récupéré de l'étape de production de VP2, à raison d'environ 2.3 g de sulfate d'ammonium par 10 mL de surnageant. Le mélange est maintenu dans ces conditions pendant 3 heures. Les culots de protéines sont obtenus par centrifugation à 8000 rpm, à 4°C pendant 15 minutes et resuspendus dans 2 mL de PBS 1X. Afin d'éliminer le maximum de sulfate d'ammonium restant dans les solutions protéiques, une dialyse contre du PBS 1X est réalisée. Chaque échantillon est mis dans un sac à dialyse d'environ 6 cm. Ces derniers sont placés dans 2 litres de PBS 1X froid et soumis à une agitation magnétique douce pendant 1 heure, à 4°C. Cette étape est effectuée trois fois de suite, en renouvelant la solution de PBS. Les échantillons sont récupérés et conservés à -80°C.

#### **IV. Expression de VP2 dans les cellules de mammifère**

##### ***IV.1. Transfection des cellules COS-7***

Les puits d'une plaque P24 (un puits par mutant et un puits servant de témoin négatif), contenant chacun une lamelle de verre circulaire, sont inoculés avec une suspension de  $4 \times 10^4$  cellules Cos-7 contenues dans 500  $\mu$ l de milieu de culture DMEM. Après une incubation de 24 heures à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, les cellules sont transfectées avec les mélanges de transfection obtenus de la manière suivante : 50  $\mu$ l de milieu DMEM sont ajoutés à 800 ng de chaque clone infectieux pB194244 $\Delta$  contenant ou non la mutation, ainsi qu'à 2  $\mu$ l de lipofectamine (une solution de lipofectamine par plasmide recombinant, est préparée). Après une incubation de 5 minutes à la température de la pièce, chaque solution de plasmide recombinant est mélangée à une solution de lipofectamine pour une autre incubation de 30 minutes à la température de la pièce. Les cellules Cos-7 préparées la veille sont rincées puis recouvertes, avec 500  $\mu$ l de DMEM froid sans sérum, ni antibiotiques. Chaque mélange plasmide recombinant/ lipofectamine, est ensuite déposé sur les cellules, dans le puits lui correspondant. Après une incubation à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, le milieu est retiré des puits et remplacé avec du milieu frais contenant du

sérum et des antibiotiques. Les lames sont récupérées et traitées pour vérifier l'expression de VP2 par la technique d'immunofluorescence (réf. Chapitre V).

## V. Méthodes d'analyse des protéines

### V.1. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS

#### *V.1.1. Préparations*

Le gel polyacrylamide en présence de SDS (ou SDS-PAGE) est composé de deux parties :

- Une partie inférieure constituée du gel de séparation de 10 % préparé avec 2 mL de la solution acrylamide-bisacrylamide 30 %, 1.5 mL de tampon de séparation Tris-Cl/SDS pH 8.8 4X (1.5 M Tris-Cl et 0.4% SDS), 60 µl de persulfate d'ammonium fraîchement préparé et 10 µl de TEMED.
- Une partie supérieure que compose le gel de concentration de 5 % préparé avec 416 µl de la solution acrylamide-bisacrylamide 30 %, 625 µl de tampon de séparation Tris-Cl/SDS, pH 8.6 4X (0.5 M Tris-Cl et 0.4% SDS), 25 µl de persulfate d'ammonium fraîchement préparé et 10 µl de TEMED.

#### *V.1.2. Technique*

Le gel de séparation est coulé en premier, puis laissé polymériser après l'avoir recouvert d'eau. Après une vingtaine de minutes l'eau est remplacée par le gel de concentration. Un peigne est immédiatement installé pour n'être retiré qu'après polymérisation du gel de concentration.

Avant d'être chargés sur le gel, les échantillons sont mélangés avec du tampon de chargement 6X (0.063 M Tris-HCl, 10% glycérol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoéthanol, 0.05% de bleu de bromophénol), puis bouillis pendant 3 minutes, afin de dénaturer les protéines. Les échantillons sont ensuite déposés sur le gel; un puits est réservé au marqueur de poids moléculaires de protéines, puis soumis à un courant électrique de 200 volts, pour leur migration. Une fois le front bleu sorti du gel, la migration est arrêtée et le



gel retiré délicatement pour être destiné soit à une coloration au bleu de Coomassie soit, à un transfert puis une immunobuvardage de type Western.

### ***V.2. Coloration au bleu de coomassie***

Le gel de polyacrylamide est incubé pendant 60 minutes dans une solution de bleu de coomassie (0.05% Coomassie brillant bleu R-250 (Bio-Rad), 50% méthanol, 10% acide acétique), puis décoloré dans une solution décolorante (40% méthanol et 10% acide acétique), jusqu'à transparence du gel.

### **V.3. Immunobuvardage de type Western**

#### **V.3.1. Solutions**

- Tampon de transfert : 10 mM acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique (CAPS), 10 % méthanol, pH 11.
- Tampon de lavage (TBS -Tween 0.1%) : 10 mM Tris, 150 mM NaCl, (pH 8.0), 0.1% Tween
- Tampon de blocage (TBS-lait 5%) : 10 mM Tris, 150 mM NaCl , pH 8.0, 5% lait
- Tampon de révélation : 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5

#### ***V.3.2. Montage et transfert***

Six papiers filtres et une membrane de nitrocellulose 0.45 µm (Biorad) sont découpés à la taille du gel de polyacrylamide et imbibés de tampon de transfert à mesure qu'ils sont déposés dans l'électroblotteur (BioRad). L'ordre de superposition est le suivant : trois papiers filtrés, le gel de polyacrylamide, la membrane et à nouveau trois papiers filtres de tampon de transfert. Le transfert est réalisé pendant 1 heure à 350 mA.

#### ***V.3.3. Révélation des protéines***

Après le transfert, la membrane est incubée dans la solution de blocage, afin de saturer ses sites libres, puis dans le premier anticorps (anti-B19 de souris) pendant une heure. Une série de 3 lavages de 5 minutes chacun dans le tampon destiné à cet effet, permet d'éliminer l'excès d'anticorps. La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline (Bio-Rad : anti-souris IgG-AP)

pendant une heure, puis lavée avec le tampon de lavage (2 fois pendant 5 minutes) et enfin, avec du TBS (1 fois pendant 5 minutes) pour éliminer le Tween. Toutes les incubations sont effectuées en agitation douce et à la température de la pièce. Les deux anticorps, primaire et secondaire, sont utilisés dilués (1 : 1000) dans le tampon de blocage. La coloration de la membrane, en présence de 10 mL de tampon de révélation contenant 100 µl de substrat NBT/BCIP, est réalisée dans l'obscurité pendant 15 minutes. La membrane est ensuite rincée à l'eau et séchée à l'air libre.

#### ***V.4. Microscopie électronique***

L'observation en microscopie électronique, des surnageants de cellules High-Five, précipités au sulfate d'ammonium, a permis de vérifier l'expression ou non des VLPs. Un volume de 50 µl de chaque échantillon est mis dans un micro-tube à ultracentrifugation, au fond duquel a été déposée une grille de cuivre recouverte d'un film de Formvar-carbone. Après une centrifugation dans une centrifugeuse (Airfuge, Air-Driven ultracentrifuge, Beckman) à 20psi (soit environ 100 000 g), pendant 5 minutes, les grilles sont séchées, puis déposées dans une goutte d'acide phosphotungstique 3% (PTA 3%, pH6) pendant 1 à 5 minutes. Après séchage, les grilles sont, à nouveau, déposées dans du PTA 3%, pendant 10 secondes et séchées, puis examinées au microscope électronique à transmission.

#### ***V.5. Immunofluorescence***

##### ***V.5.1. Cas des cellules Sf9***

Des lamelles de verre circulaires sont déposées dans les puits d'une plaque P6 (un puits par stock viral, en plus d'un puits servant de témoin négatif). Chaque puits est inoculé avec 2 mL d'une suspension cellulaire contenant  $1.5 \times 10^6$  cellules Sf9. Celles-ci sont ensuite infectées avec 100 µl du stock de baculovirus recombinant. Après trois jours d'infection, les lamelles sont transférées dans les puits d'une plaque P24 et les cellules sont fixées, pendant 30 minutes à la température de la pièce, avec 500 µl de tampon d'immunofluorescence (PBS 1X, 0.1% Tween 20, 0.1% BSA et 0.02% NaN3) contenant 3% de formaldéhyde. Après trois rinçages au PBS 1X, les cellules sont incubées, pendant 30 minutes, dans 500 µl de tampon d'immunofluorescence contenant 3% de Triton X-

100. Les cellules sont, à nouveau, rincées trois fois au PBS 1X, puis mises en présence de l'anticorps primaire (anti-B19 dilué dans le tampon d'immunofluorescence 1/1000), pendant 1 heure. Après trois autres rinçages au PBS 1X, 500 µl de l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Molecular Probes : Alexa-488 anti-souris Ig-G) dilué dans le tampon d'immunofluorescence 1/1000) sont ajoutés. Après une heure d'incubation, les cellules sont rincées trois fois au PBS 1X, puis observées au microscope à fluorescence.

#### *V.5.2. Cas des cellules Cos-7*

Les lamelles récupérées après transfection des cellules COS-7 avec les différents clones infectieux, sont traitées tel que décrit pour l'immunofluorescence sur des cellules Sf9.

#### *V.6. Microscopie confocale*

Dans le cas des cellules COS-7, les mêmes lamelles obtenues à la fin de l'étape d'immunofluorescence (*réf.* Chapitre V.5), sont observées sous microscopie confocale (Bio-Radiance 2000) au grossissement 40X (objectif à immersion à huile; total 400X).

Dans le cas des cellules Sf9, une étape de coloration au DRAQ-5 (Biostatus Limited), permettant une délimitation du noyau, est ajoutée à la démarche décrite pour l'immunofluorescence (*réf.* Chapitre V.5). Cette étape se situe avant le retrait des lamelles. Dans chaque puits, 1 mL de milieu est enlevé et 1 µl de DRAQ-5 est ensuite déposé. Après 5 minutes d'incubation à la température de la pièce, les lamelles sont récupérées et traitées tel que décrit précédemment (*réf.* Chapitre V.5), puis analysées au microscope confocal au grossissement 40X.

## **VI. Production d'anticorps recombinants par phage display**

Deux stocks constituent la banque Tomlinson. Toutes les étapes décrites dans le présent chapitre sont réalisées, en parallèle, pour chacun des deux stocks bactériens, I et J. Les capsides recombinantes (VLPs) du B19, formées de VP2WT et récupérées après précipitation au sulfate d'ammonium, constituent la solution d'antigène utilisé comme cible dans ce protocole.

### ***VI.1. Croissance de la banque***

La première étape consiste à inoculer 200 mL de milieu 2TY contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et 1 % de glucose, avec 25 µl du stock bactérien et laisser croître la culture à 37°C en agitation, jusqu'à l'obtention d'une densité optique (D.O.) de 0.5 (90 à 120 minutes). (Les D.O. sont toujours prises à 600 nm). Un volume de 50 mL de la culture bactérienne est infectée avec 100 µl ( $2 \times 10^{11}$ ) de phage auxiliaire KM13<sup>3</sup>. Le reste des 475 mL de culture servira à faire les stocks de banques secondaires. Les bactéries infectées sont incubées à 37°C sans agitation, afin de permettre l'infection, puis centrifugées à 3000g pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu doucement dans 50 mL de milieu 2TY contenant de l'ampicilline (100 µg/mL), de la kanamycine (25 µg/mL) et 1 % de glucose. (Les quantités d'antibiotique sont identiques dans tous les protocoles). Après une incubation toute la nuit à 30°C sous agitation, la culture bactérienne est centrifugée à 3300 g pendant 30 minutes et le surnageant récupéré. 1/5 volume de PEG/NaCl (20 % Polyéthylène glycol, 2.5 M NaCl) est ajouté au surnageant. Le tout est bien mélangé et laissé une heure ou plus à 4°C. Après une centrifugation à 3300 g pendant 30 minutes, le culot est resuspendu dans 2 mL de PBS. Une autre centrifugation 11600 g pendant 10 minutes permet d'éliminer les débris cellulaires restant. Le surnageant de phages est conservé à 4°C à court terme. Pour une conservation à long terme à -80°C, les phages sont mis dans 15 % de glycérol.

### ***VI.2. Première sélection***

Un volume de 100 µL de solution d'antigène (VLPs obtenues dans la section III.5) mélangé à 900 µL de PBS est mis dans un immunotube et conservé à la température de la pièce toute la nuit, afin de permettre la fixation de la cible à son support. Le jour suivant, le tube est rincé 3 fois avec du PBS/Tween-20 0.1%, puis rempli avec jusqu'au bord avec du PBS/lait 2%, afin de bloquer les sites de liaison restés disponibles. Après une incubation de 2 heures en rotation et à la température de la pièce, le tube est à nouveau rincé 3 fois avec du PBS/Tween-20 0.1%.

Un volume de 500 µL PBS/lait 2% est additionné à 500 µL de phages obtenus dans la section VI.1., et le tout est incubé pendant 1 heure à la température de la pièce.

Les phages qui ne se sont pas liés sont jetés. Le tube est lavé 10 fois avec du PBS-Tween-20 0.1 % puis 1 fois avec du PBS pour éliminer le détergent. L'excès de PBS est éliminé du tube et les phages sont élués en ajoutant 250  $\mu$ L de trypsine diluée dans du PBS à 10 mg/mL et en mettant en rotation continue pendant 10 minutes. Un volume de 1 mL de PBS/BSA 0.1% est ajouté au tube. Après agitation, les phages sont conservés à 4°C ou utilisés pour l'infection à la sélection suivante.

Un volume de 600  $\mu$ L des phages élués est ajouté à 1.75 mL d'une culture TG1 en phase exponentielle. Après une incubation pendant 30 minutes en agitation à 37°C, la culture est centrifugée à 11600 g pendant 10 minutes. Le culot bactérien est resuspendu dans 10 mL de milieu 2TY et étalé sur une grande pétri Nunc Bio-Assay (30 cm X 30 cm) de TYE contenant de l'ampicilline (100  $\mu$ g/mL) et 1 % de glucose. Afin de s'assurer que les bactéries TG1 de départ n'étaient pas contaminées, 100  $\mu$ L de la culture sont étalés sur une pétri TYE/ampicilline (100  $\mu$ g/mL)/1 % de glucose. Toutes les boîtes sont incubées à 30°C toute la nuit.

### ***VI.3. Préparation des phages***

Les bactéries de la boîte de Pétri Bio-Assay sont stérilement récupérées avec 2 mL de milieu 2TY (ampicilline-1 % glucose) à l'aide d'un râteau. Une inoculation de 50 mL de milieu 2TY (ampicilline-1 % glucose) avec 50  $\mu$ L de bactéries est ensuite effectuée. Le reste des bactéries est conservé à -80°C en présence de 15% glycérol. Après une incubation à 37°C en agitation pendant environ 4 heures (pour une D.O d'environ 0.5), 10  $\mu$ L du phage auxiliaire KM13 sont ajoutés à 10 mL de la culture bactérienne. Celle-ci est ensuite incubée à 37°C pendant 30 minutes sans agitation, puis centrifugée à 3000 g pendant 10 minutes. Le culot est ensuite resuspendu doucement dans 50 mL de milieu 2TY (ampicilline et kanamycine) et incubé toute la nuit à 30°C sous agitation. Cette culture est centrifugée le jour suivant à 3300 g pendant 30 minutes. Un volume de 20 mL de PEG/NaCl (20% polyéthylène glycérol 6000, 2.5M NaCl) est ajouté au surnageant. Le tout est bien mélangé et laissé au moins 1 heure à 4°C. Une centrifugation à 3300 g pendant 30 minutes est suivie de l'aspiration du surnageant. Cette opération peut être renouvelée en centrifugeant brièvement, afin de s'assurer de l'élimination de tout le

PEG/NaCl. Le culot est resuspendu dans 4 mL de PBS et centrifugé à 11600 g dans une micro-centrifugeuse pour éliminer les débris cellulaires restants. Les phages peuvent être conservés à 4°C pour être utilisé pour le tour de sélection suivant ou à -80°C pour un stockage à plus long terme.

La sélection, à partir de la section VI.2., est refaite deux fois.

#### ***VI.4. Production de scFvs solubles***

Les phages élués à chaque sélection sont utilisés à un volume de 10 µL pour infecter 5 mL d'une culture de la souche HB2151 (non-suppressive) en phase de croissance exponentielle (D.O. 0.5-0.7). Après une incubation à 37°C pendant 30 minutes sans agitation, les cultures infectées sont centrifugées à 11600 g pendant 10 minutes. Les culots sont ensuite resuspendus dans 1 mL de milieu 2TY et des dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$  sont préparées à partir de chaque échantillon. Ces dernières sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant ampicilline et 1 % glucose, puis incubées à 37°C toute la nuit.

Des plaques de 96 puits (selon le nombre de colonies à tester) contenant 100 µL de milieu 2TY (ampicilline-1 % glucose) est inoculée à partir des colonies isolées obtenues et mise à incuber toute la nuit à 37°C sous agitation.

Un inoculum (2 µL) est transféré dans chaque puits de nouvelles plaques de 96 puits contenant 200 µL de milieu 2TY frais (ampicilline/glucose 0.1 %), puis incubé à 37°C jusqu'à une D.O. de 0.9. Les plaques, nommées « Master plates », contenant le reste des cultures sont conservées à -80°C en présence de 15% glycérol. Une fois cette densité optique atteinte, de l'IPTG 1 mM final est ajouté. Les plaques sont remises en agitation à 30°C pendant 16 à 24 heures.

Le jour suivant, les plaques ELISA 96 puits, tapissée la veille avec 10 µL de la solution d'antigène diluée au  $1/20^{\text{ème}}$  dans du PBS, sont lavées 3 fois avec du PBS et bloquées avec une solution PBS/lait 2 % pendant 1 heures à la température de la pièce. Les plaques contenant les cultures bactériennes sont centrifugées à 1000 rpm pendant 10

minutes, puis 100  $\mu$ L des surnageants obtenus (contenant les scFvs) sont ajoutés aux plaques ELISA après avoir lavé ces dernières 3 fois avec du PBS. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant 1 heure, puis lavées 3 fois avec du PBS/Tween20 0.1%. La protéine L (diluée 1:5000 dans du PBS) est ajoutée à raison de 100  $\mu$ L par puits. Après une incubation d'une heure à la température de la pièce, le développement est réalisé avec le substrat TMB (100  $\mu$ L par puits). La réaction est arrêtée par l'ajout de 20  $\mu$ L d'acide chlorhydrique 2N dès l'apparition de la couleur bleue dans les puits. La coloration passe du bleu au jaune et la densité optique est lue à 450 nm sur un lecteur de plaque Bio-Rad.

Le test ELISA est refait avec des quantités plus importantes de scFvs, afin de vérifier les résultats obtenus. Pour ce faire, pour chaque clone, un inoculum (10  $\mu$ L) des « Master plates » est transféré dans 50 mL de milieu 2TY (ampicilline-0.1 % glucose). Les étapes d'expression de scFvs, ainsi que du test ELISA sont similaires à celles décrites précédemment. Après centrifugation des cultures bactériennes et utilisation des surnageants comme anticorps primaire pour le test ELISA, le reste de ces derniers (renfermant les scFvs) est conservé à -80°C.

## ***VI.5. Vérification de la spécificité et des applications des scFvs***

### ***VI.5.1. ELISA***

Le test ELISA décrit dans ce chapitre a pour objectif de vérifier la spécificité du clone paraissant le plus positif dans l'étape précédente. Le surnageant en question est testé en ELISA comme anticorps primaire. La plaque ELISA est préparée la veille avec des puits contenant la solution d'antigène aux dilutions : 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, et la BSA (100 ng/puits) servant de témoin négatif. Les étapes sont similaires à celles décrites dans la section VI.4.).

### ***VI.5.2. Immunobuvardage de type Western***

La spécificité du scFv obtenu est également testée en immunobuvardage de type Western. Sur un gel de polyacrylamide-SDS, deux puits sont prévus pour déposer 20  $\mu$ L/puits de la solution d'antigène (VLPs formées de VP2 sauvage obtenues par

précipitation au sulfate d'ammonium ). Après migration, suivie d'un transfert sur une membrane nitrocellulose (voir section V.3.2), cette dernière est découpée pour séparer les deux échantillons, afin qu'ils soient traités séparément : dans un cas, l'anticorps primaire utilisé est le scFv (surnageant obtenu dans la section VI.4), dans le second, il s'agit de l'anti-B19 commercial servant de témoin positif. Les mêmes étapes décrites dans la section V.3.3. sont réalisées pour la révélation des protéines, à l'exception que dans le cas du scFv, après l'utilisation de l'anti-histidine (1:1000) comme anticorps secondaire, l'anti-IgG de souris couplé à la phosphatase alcaline (1:1000) sert d'anticorps tertiaire. Des lavages avec du TBS/Tween20 0.1% précèdent cette étape.

#### *VI.5.3. Immunofluorescence*

Dans le but de vérifier l'efficacité du scFv en immunofluorescence, des cellules sf9 sont préparées et infectées tel que décrit dans la section V.5.1. Le stock viral utilisé est le P3/VP2wt (stock de baculovirus renfermant le gène VP2 non-muté) et la durée d'infection est de 72 heures. Après fixation au formaldéhyde et traitement au Triton X-100, les cellules sont lavées au PBS puis mises en présence de 200 µl du surnageant scFv, pendant 1 heure. Après trois autres rinçages au PBS, 500 µl de l'anti-histidine (1:1000) sont ajoutés pour une durée d'une heure et à température ambiante. Après 3 lavages au PBS, les cellules sont incubées, pendant 1 heure, dans 500 µl de l'anticorps tertiaire couplé à un fluorochrome (Molecular Probes : Alexa-488 anti-souris Ig-G) dilué à 1:1000. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS, puis observées au microscope à fluorescence. Des cellules non infectées sont, en parallèle, traitées de la même façon, afin de servir de témoin négatif.



## ***RÉSULTATS***

## **I. Expression de capsides recombinantes (VLPs) composées de la protéine VP2 mutée et sauvage dans le système baculovirus**

Pour exprimer la protéine de capside du B19, VP2, nous avons choisi le système BAC-to-BAC (Invitrogen). Ce dernier nécessite l'introduction du gène d'intérêt VP2 dans le vecteur pFatsBac1, afin que puisse se faire sa transposition dans le génome du baculovirus AcNPV (Bacmide). L'amplification de ce dernier dans les cellules Sf9, puis l'expression de la protéine dans les cellules High Five, sont alors possibles.

### ***I.1. Obtention de l'insert***

Le gène VP2 a été amplifié par une réaction PCR en utilisant la paire d'amorces appropriée. Le clone infectieux B194244 $\Delta$  contenant la totalité du génome du B19, a servi de matrice pour la réalisation de cette amplification. Le fragment attendu est d'une taille de 1675 pb et est présenté sur la *figure (16)*.

### ***I.2. Clonage dans le vecteur pFastBac1***

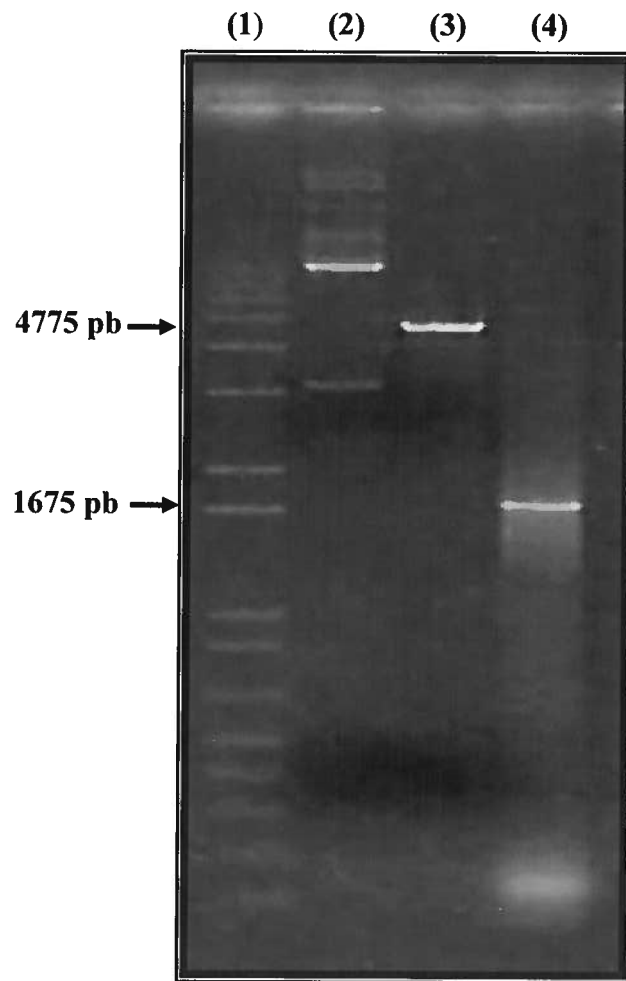
Après une digestion avec les enzymes de restriction *EcoRI* et *SphI*, le produit de PCR est ligué avec le vecteur pFastBac1, lui-même préalablement digéré avec les mêmes enzymes. L'ADN de plusieurs clones a été extrait et analysé par digestion (*EcoRI* et *SphI*), afin de vérifier la présence éventuelle du gène VP2. Plusieurs clones se sont révélés positifs. Un parmi ces derniers a été purifié, puis séquencé dans les deux directions, en utilisant les amorces spécifiques du vecteur pFstBac1 (Fast-F et Fast-R).

### ***I.3. Obtention des mutants***

Les mutations ont été introduites séparément dans le gène VP2 par mutagenèse dirigée, en utilisant les amorces spécifiques à chaque mutation. Le vecteur recombinant pFastBac1/VP2 obtenu précédemment a servi de matrice pour la réalisation de la réaction de mutagenèse.

Cinq clones par mutation, ont été purifiés, puis séquencés à l'aide d'amorces appropriées, en vue de vérifier la présence de la mutation. Celle-ci s'est révélée positive dans tous les clones. Ainsi, en plus du pFastBac1/VP2 initial (pFatsBac1-VP2Wt), nous

**Figure 16 :** Digestions avec les enzymes *EcoRI* et *SphI* effectuées sur le vecteur pFastBac I et PCR réalisée sur le clone infectieux B194244Δ (gel d'agarose 1%)



De gauche à droite :

- (1) : Marqueur de poids moléculaire (pb), 1Kb
- (2) : Vecteur pFastBac1 non digéré
- (3) : Vecteur pFastBac1 digéré (*EcoRI* et *SphI*)
- (4) : Résultat de PCR sur le clone infectieux B194244Δ

dispositions de quatre autres vecteurs recombinants, chacun contenant le gène VP2 doté d'une mutation (pFatsBac1-VP2D, pFatsBac1-VP2N, pFatsBac1-VP2T et pFatsBac1-VP2W) (*tableau 3*).

#### ***1.4. Obtention des Bacmides recombinants***

La stratégie de criblage des bacmides recombinants repose sur la transformation de bactéries DH10Bac avec chacun des pFastBac1 recombinants, suivie de la sélection de cinq colonies blanches, dont l'ADN est soumis à une réaction PCR en utilisant les amorces spécifiques du gène VP2. La première étape permet la transposition des différents inserts dans le génome du baculovirus (Bacmide), la seconde confirme la présence de ces derniers. Un résultat positif a été obtenu pour tous les clones.

#### ***1.5. Transfection des cellules Sf9***

Dans chaque cas (VP2 non-muté et VP2 muté), un seul clone de Bacmide recombinant, a été utilisé pour transfecter des cellules Sf9. Les surnageants récupérés six jours post-transfection, ont constitué les premiers stocks (P1) de baculovirus recombinants (P1-VP2Wt, P1-VP2D, P1-VP2N, P1-VP2T, P1-VP2W). Aucun signe d'infection n'a été observé à cette étape.

#### ***1.6. Vérification de l'expression de VP2***

La vérification de l'expression des protéines VP2 mutée et non-mutée, a été réalisée sur des cellules High Five cultivées sur une plaque P6 et infectées avec 200 µl de P1, dans le cas de chaque baculovirus recombinant. Un puits de cellules non infectées a été réservé pour servir de témoin négatif.

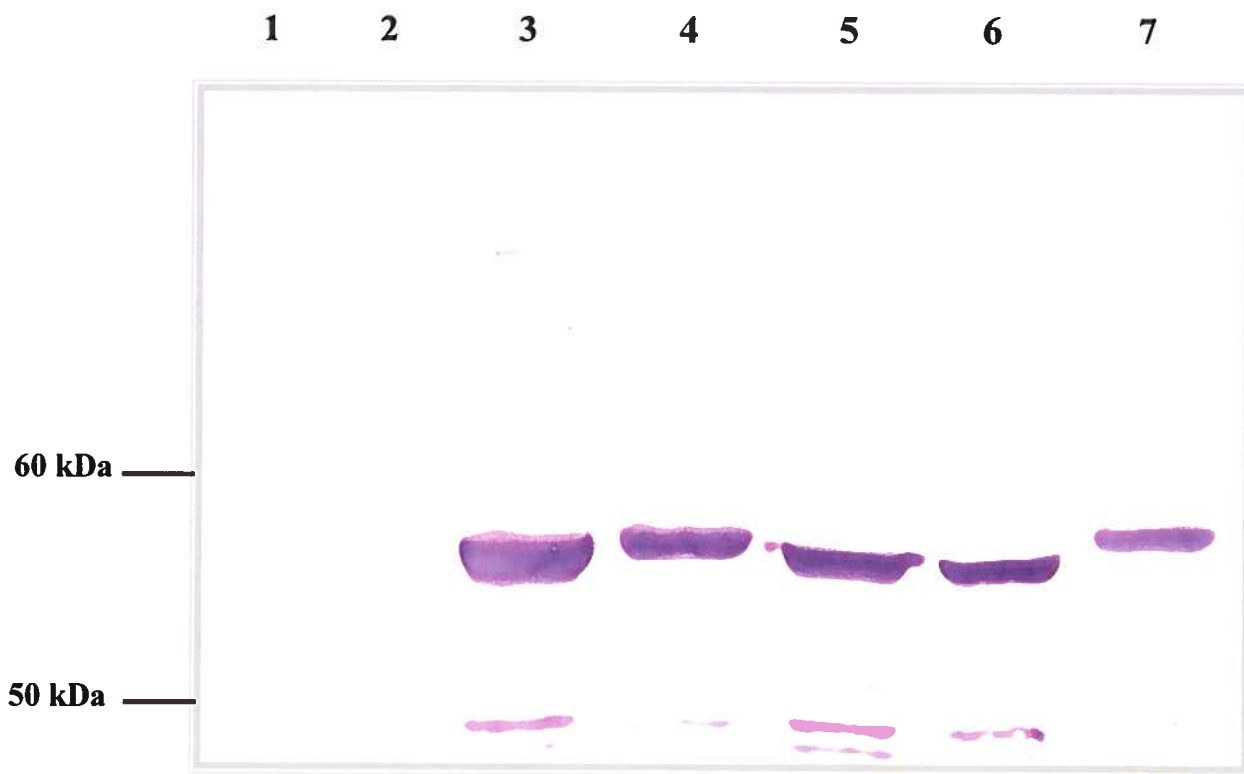
##### ***1.6.1. Par immunobuvardage de type Western***

Trois jours post-infection, les extraits totaux des cellules High Five infectées et non infectées, ont été analysés par immunobuvardage de type Western. Une bande a été obtenue à la hauteur espérée (58 kd) aussi bien pour le type sauvage que pour les différents mutants. La protéine VP2 a été détectée avec l'anticorps monoclonal anti-B19 (R92F6) (*figure 17*).

**Figure 17** : Immunobuvardage de type Western sur des culots de cellules High Five infectées (anticorps anti-B19 R92F6).

Une bande à la hauteur attendue (58kDa) a été obtenue aussi bien dans le cas de la VP2 sauvage que dans celui de la VP2 mutée.

- (1) : Marqueur de poids moléculaire
- (2) : Cellules High Five non infectées
- (3) : VP2 Wt à partir de cellules High Five
- (4) : VP2 D à partir de cellules High Five
- (5) : VP2 N à partir de cellules High Five
- (6) : VP2 T à partir de cellules High Five
- (7) : VP2 W à partir de cellules High Five



### *1.6.2. Par immunofluorescence indirecte*

Après trois jours post-infection, les cellules High Five infectées et non infectées, ont été analysées par immunofluorescence indirecte. L'expression de la protéine VP2 a été confirmée en utilisant le même anticorps que précédemment (*figure 18*).

### *1.7. Amplification des baculovirus et titrage des stocks viraux*

Une fois l'expression de la protéine VP2 vérifiée pour les différents stocks viraux, ces derniers ont été amplifiés, dans le but de constituer des stocks de travail suffisants. L'amplification se fait, à partir des stocks P1 (ceux obtenus après transfection), par passage sur des cellules Sf9 contenues dans des boîtes de 25 cm<sup>2</sup> (obtention du stock P2), puis 75 cm<sup>2</sup> (obtention du stock P3). La durée de l'infection étant de six jours à chaque étape. Le titrage des différentes suspensions virales P3 a été réalisé par la méthode de Reed et Muench (1938).

### *1.8. Expression des VP2 dans les cellules High Five*

Dans le but d'obtenir un meilleur rendement d'expression de la protéine VP2, environ 15x10<sup>6</sup> cellules High Five contenues dans des boîtes de 150 cm<sup>2</sup>, ont été infectées avec les différents stocks P3, à une multiplicité d'infection de 0.5. Après cinq jours post-infection, les surnageants (P4) ont été récupérés, en vue de vérifier la présence de capsides recombinantes (VLPs).

### *1.9. Précipitation des VLPs au sulfate d'ammonium*

Une précipitation séquentielle au sulfate d'ammonium a permis de fixer 40% comme pourcentage de saturation idéal pour séparer les VLPs des autres protéines contenues dans les surnageants récupérés précédemment.

Après précipitation de ces derniers à 40% sulfate, les fractions obtenues ont été analysées en microscopie électronique et par immunobuvardage de type Western.

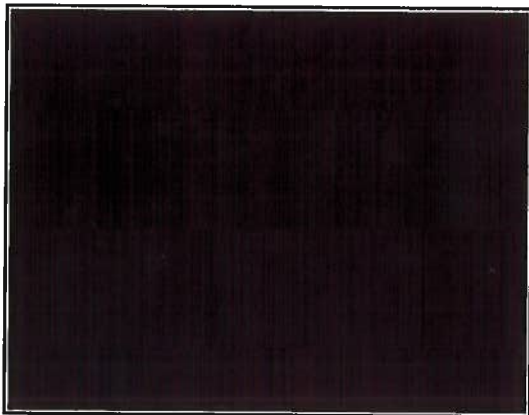


**Figure 18** : Immunofluorescence sur des cellules High Five infectées (anticorps anti-B19 R92F6).

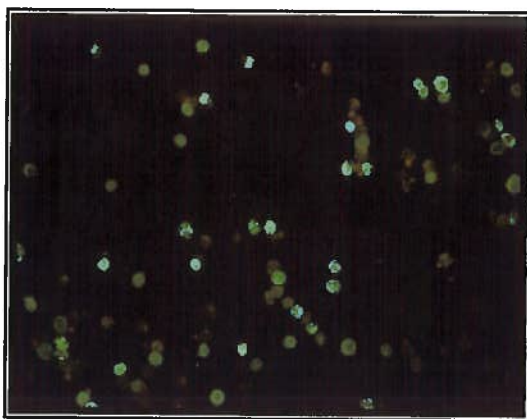
La présence de la fluorescence dans le cas du type sauvage et des mutants, ainsi que son absence dans le cas du contrôle négatif démontrent que que VP2 est bien exprimée.

- (A) : Cellules High Five non infectées (contrôle négatif).
- (B) : Cellules infectées avec le stock P1-VP2Wt.
- (C) : Cellules infectées avec le stock P1-VP2D.
- (D) : Cellules infectées avec le stock P1-VP2N.
- (E) : Cellules infectées avec le stock P1-VP2T.
- (F) : Cellules infectées avec le stock P1-VP2W.

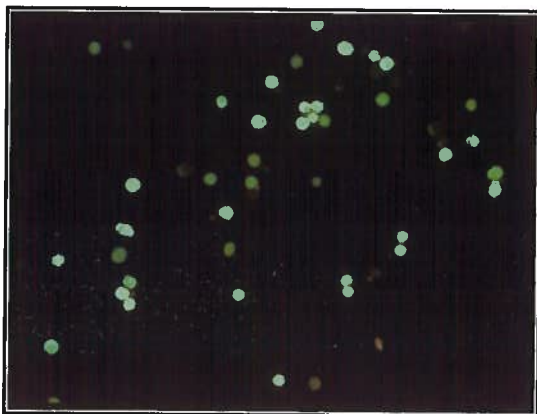
A



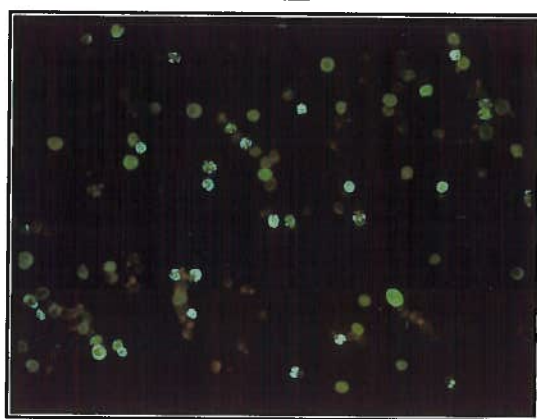
B



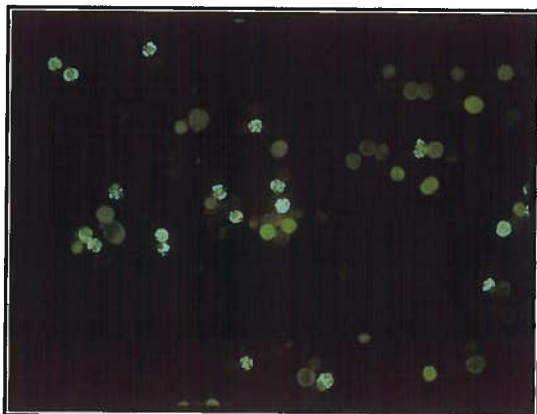
C



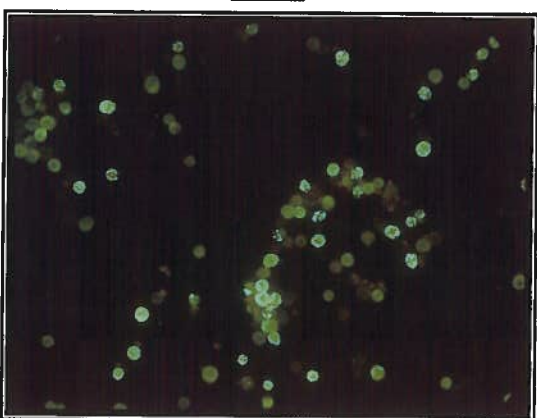
D



E



F



### *1.9.1. Vérification de la présence de VP2*

La présence de la protéine VP2 dans les fractions résultant de la précipitation des différents surnageants, a été vérifiée par immunobuvardage de type western. Seules les fractions VP2 de type sauvage, ainsi que VP2T contenaient des VLPs avec tout de même une proportion moindre pour la VP2 mutée en T comparé au type sauvage (*figure 19*).

### *1.9.2. Vérification de l'expression des VLPs par microscopie électronique*

Le résultat observé en immunobuvardage a été confirmé par l'observation des différentes fractions en microscopie électronique. En effet, celle-ci a révélé la présence de VLPs seulement pour le type sauvage et la VP2T et non pour les trois autres mutants. Par ailleurs, les résultats illustrés dans les figures *20-A* et *20-B*, montrent bien la différence dans les proportions de capsides formées dans ces deux cas.

### *1.10. Localisation cellulaire de la protéine VP2*

Dans le but de déterminer l'étape de l'assemblage de la capside au niveau de laquelle chaque mutation agirait pour bloquer ce processus, nous nous sommes intéressés à la distribution cellulaire de la protéine VP2.

L'analyse des cellules High Five infectées avec les différents stocks de baculovirus recombinants P3 (P3-VP2Wt, P3-VP2D, P3-VP2N, P3-VP2T et P3-VP2W), en microscopie confocale en utilisant l'anticorps anti-B19, a montré une localisation des protéines VP2, à la fois nucléaire et cytoplasmique pour les différentes constructions (*figure21*).

## **II. Expression de capsides composées de la protéine VP2 mutée ou non dans les cellules de mammifère**

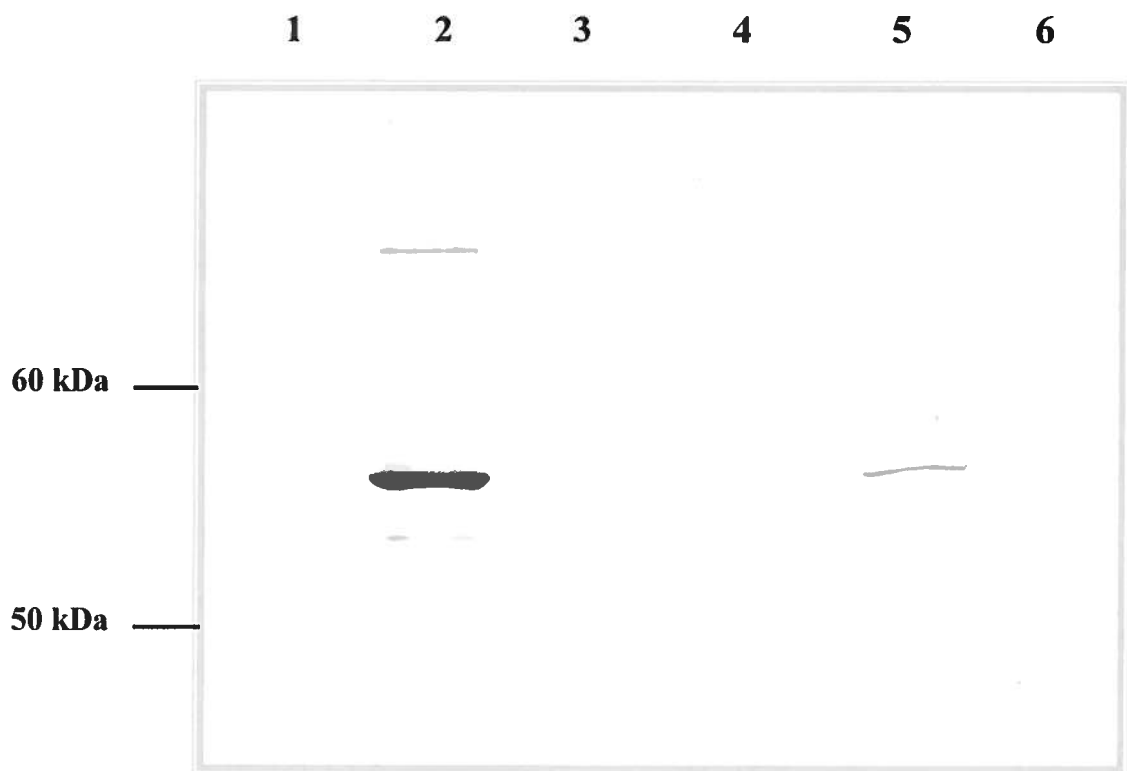
### *II.1. Construction des clones*

La présence des mutations dans les clones infectieux B19/VP2D, B19/VP2N, B19/VP2T et B19/VP2W construits, a été vérifiée en séquençant cinq clones par mutant. Au moins trois par cas se sont révélés positifs.

**Figure 19 :** Immunobuvardage de type Western sur les fractions résultant de la précipitation des capsides recombinantes au sulfate d'ammonium à partir des surnageants de cellules High Five infectées (anticorps anti-B19 R92F6).

Une bande à la hauteur attendue (58 kDa) a été obtenue seulement dans le cas de la VP2 sauvage et la VP2 mutée au niveau de l'acide aminé T146. Une différence dans les proportions est à noter.

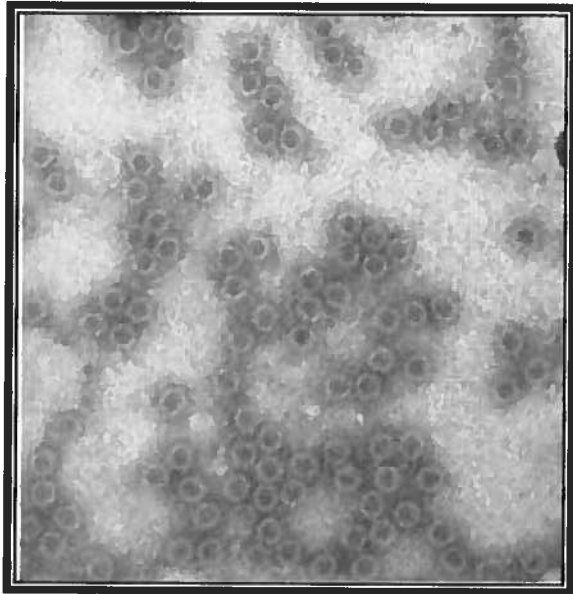
- (1) : Marqueur de poids moléculaire
- (2) : Fraction après précipitation sulfate de P4-VP2 Wt
- (3) : Fraction après précipitation sulfate de P4-VP2 D
- (4) : Fraction après précipitation sulfate de P4-VP2 N
- (5) : Fraction après précipitation sulfate de P4-VP2 T
- (6) : Fraction après précipitation sulfate de P4-VP2 W



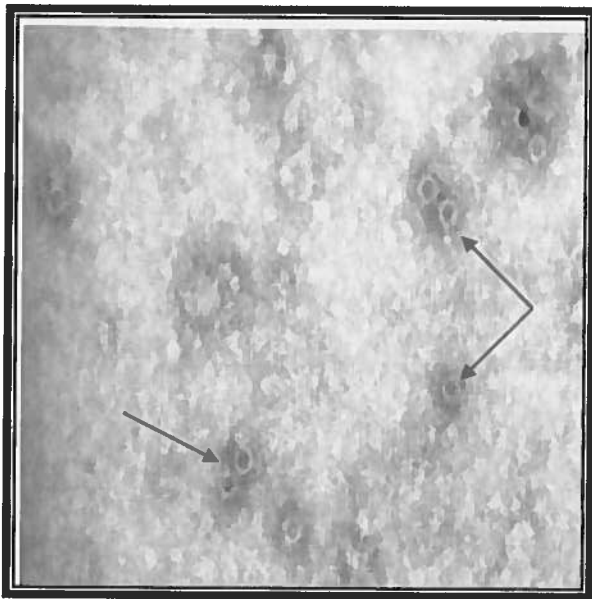
**Figure 20** : Microscopie électronique sur les fractions résultant de la précipitation des capsides recombinantes au sulfate d'ammonium à partir des surnageants de cellules High Five infectées.

(A) : Capsides recombinantes formées de la protéine VP2 non mutée (VP2Wt). (B) : Capsides recombinantes formées de la protéine VP2 mutée au niveau de la thréonine en 146, indiquées avec des flèches.

**A**



**B**



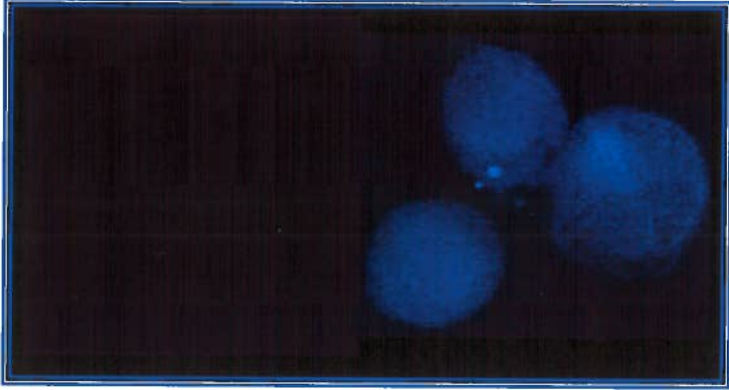
**Figure 21** : Images obtenues en microscopie confocale de cellules High Five infectées avec les baculovirus recombinants.

(A) Cellules High Five non infectées (contrôle négatif), (B) P3-VP2Wt, (C) P3-VP2D, (D) P3-VP2N, (E) P3-VP2T et (F) P3-VP2W.

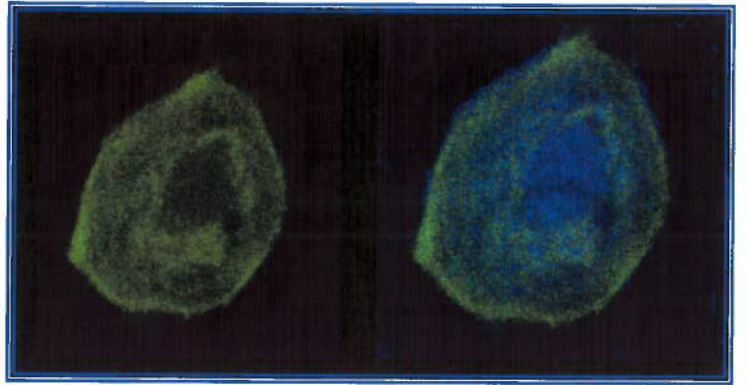
Les protéines VP2 ont été détectées avec l'anticorps monoclonal anti-B19 (R92F6) et les noyaux sont mis en évidence en bleu en utilisant le colorant DRAQ-5. La répartition cellulaire de la fluorescence, et donc de la protéine VP2, semble aussi bien nucléaire que cytoplasmique.



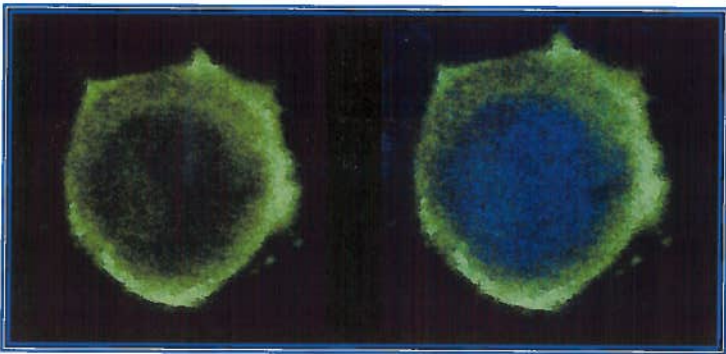
A



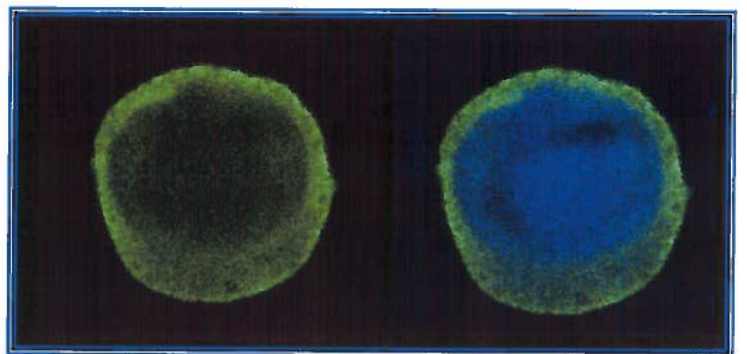
B



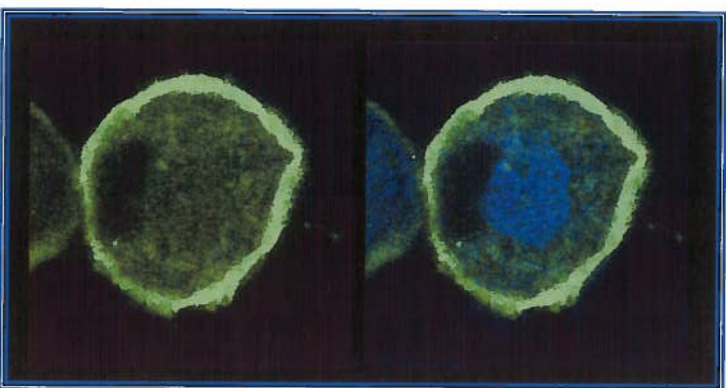
C



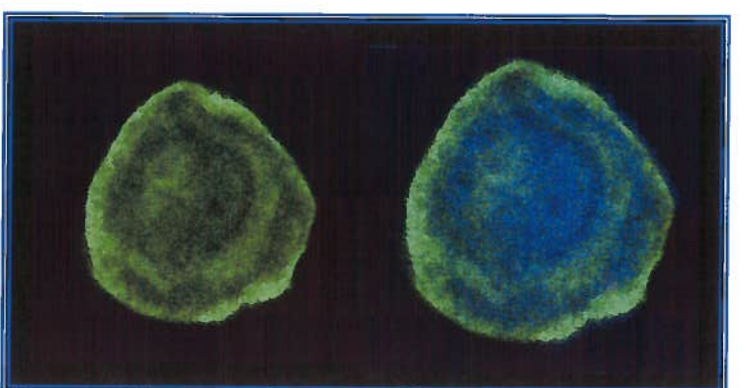
E



D



F



## ***II.2. Localisation cellulaire de VP2 par microscopie confocale***

Les clones infectieux (un par cas) purifiés ont servi à transférer des cellules Cos-7. L'observation de ces dernières en microscopie confocale avait pour objectif de déterminer la localisation cellulaire des VP2. La détection des protéines a été réalisée avec l'anticorps anti-B19. Seule la transfection des cellules Cos-7 avec le clone infectieux de type sauvage a été concluante et a révélé une localisation nucléaire de la protéine VP2 (*figure 22*). Malgré diverses tentatives, les transfections avec les différents mutants, se sont, malheureusement, soldées par un échec.

## **III. Production d'anticorps recombinants anti-VLP par phage display**

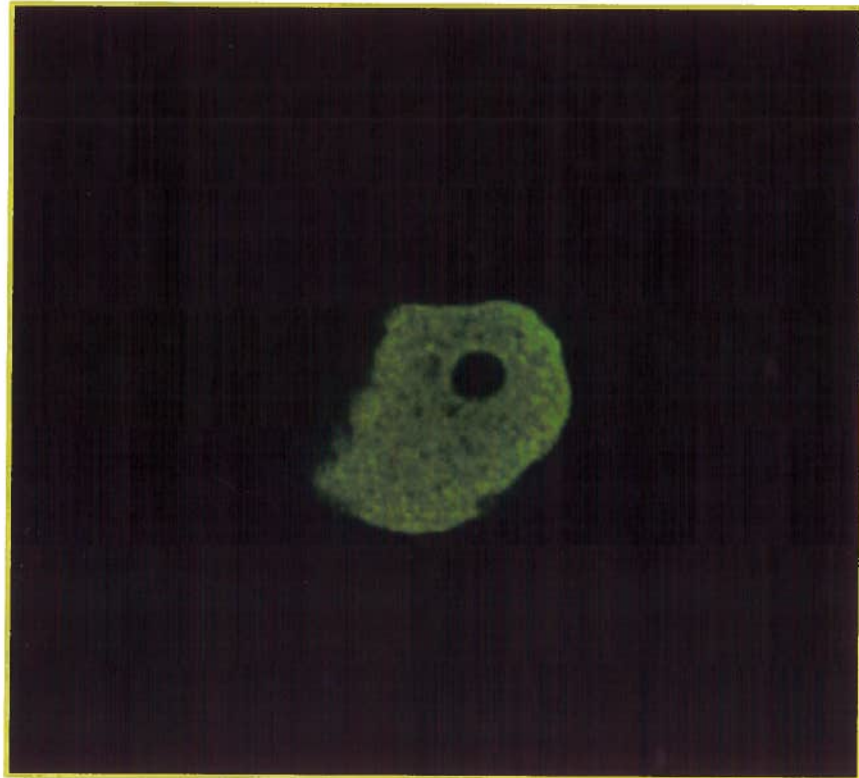
Afin d'obtenir des anticorps scFv spécifiques de la capsid du B19, nous avons recouru à la technique du phage display, en utilisant comme cibles les VLPs constituées de la VP2 non mutée, obtenues après précipitation au sulfate d'ammonium. Cette technique passe par la production, à partir d'une banque de phages exprimant des scFv de spécificités diverses, suivie d'un certain nombre de tours de sélection. Chacun de ces derniers comprend la mise en contact des phages avec la protéine d'intérêt, ainsi que l'amplification des phages spécifiques récupérés par élution.

En suivant soigneusement le protocole fourni avec les banques d'anticorps Tomlinson I et J, après trois tours de sélection suivis d'un test ELISA soumis sur les clones individualisés, un clone scFv positif spécifique des VLPs a été obtenu. Les phages exprimant celui-ci ont servi à l'infection de cellules non-suppressives (HB2151), dans le but d'obtenir l'anticorps recombinant sous forme soluble.

Un test ELISA refait avec différentes dilutions du scFv soluble, a permis de confirmer le résultat obtenu. Le graphique présenté dans la *figure (23)* montre que la diminution de la densité optique est dose dépendante, ce qui confirme la spécificité de l'anticorps pour la capsid recombinante du B19.

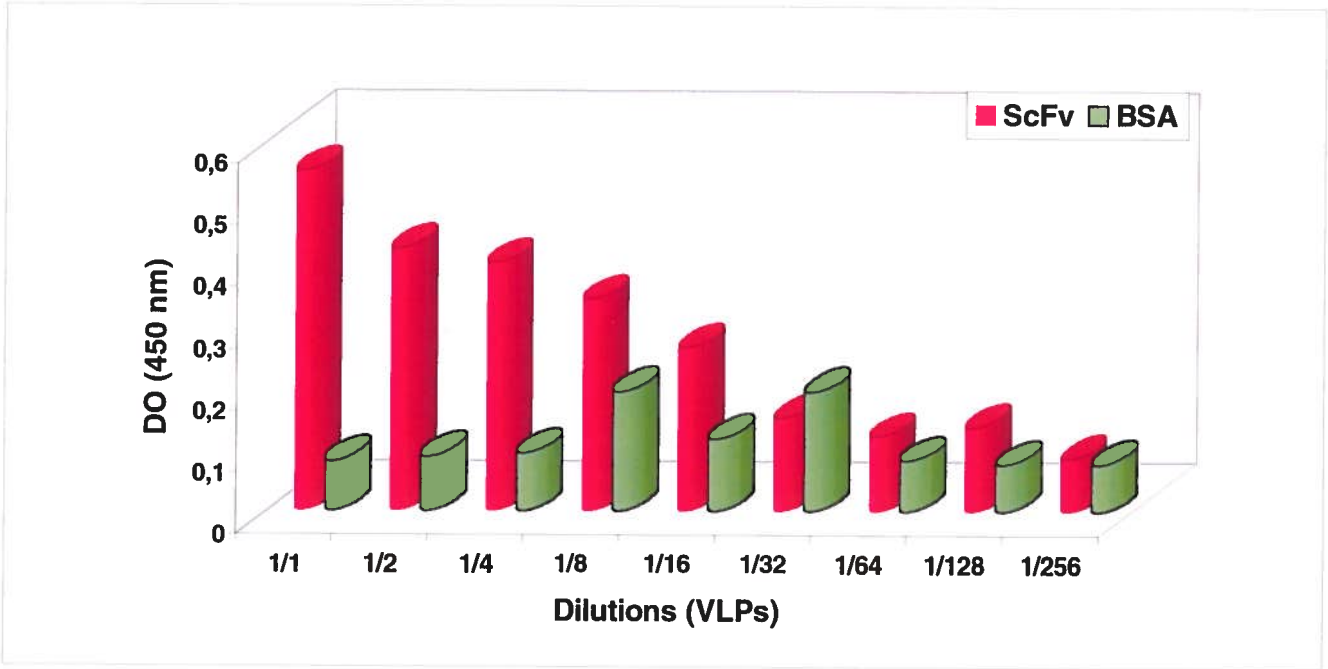
**Figure 22** : Image obtenue en microscopie confocale de cellules Cos-7 transfectées avec le clone infectieux de type sauvage.

Les protéines VP2 ont été détectées avec l'anticorps monoclonal anti-B19 (R92F6).



**Figure 23 :** Cinétique de fixation du scFv produit aux capsides recombinantes VP2 précipitées au sulfate d'ammonium, déterminée par ELISA .

La BSA a servi de contrôle négatif.

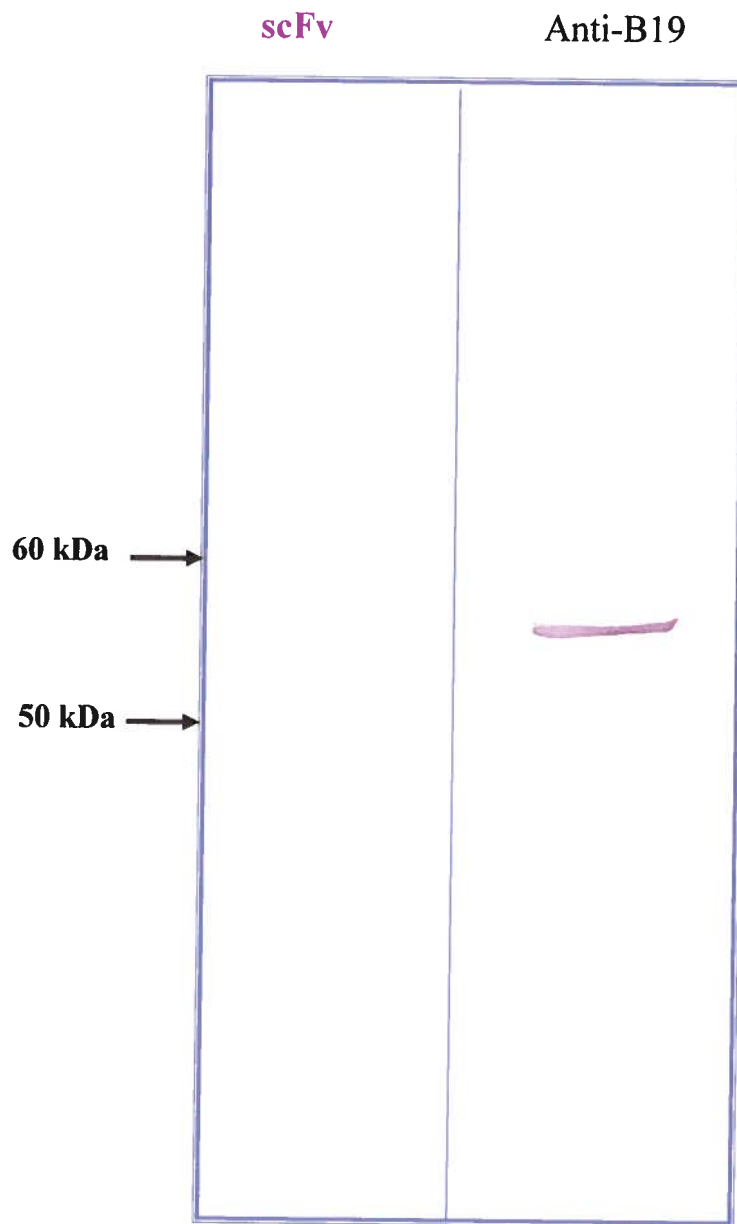


En immunobuvardage de type Western, la détection de la protéine VP2 avec le scFv s'est révélée négative. En effet, aucune bande n'est obtenue dans le cas du scFv, tandis que dans le témoin positif (anti-B19 commercial), une bande apparaît à la hauteur attendue (*figure 24*). Les deux expériences ont été menées en parallèle.

**Figure 24 :** Immunobuvadage de type Western avec le scFv produit sur les particules recombinantes VP2 précipitées au sulfate d'ammonium..

L'utilisation de l'anticorps anti-B19 commerciale a servi de témoin positif.





## ***DISCUSSION***

## **I. Expression des capsides recombinantes composées de la protéine VP2 sauvage ou mutée dans le système baculovirus**

Parmi les différents systèmes d'expression protéique, le système « Baculovirus » est particulièrement attractif et a largement servi à l'expression de particules recombinantes (VLPs) de plusieurs virus (Urakawa et al., 1989; Sabara et al., 1991; French et al., 1990; Rose et al., 1993; Brown et al., 1990; Saliki et al., 1992; Martinez et al., 1992; Christensen et al., 1993; Christensen et al., 1994). Ce système a démontré sa grande efficacité aussi bien sur le plan qualitatif (production de protéines recombinantes ayant les mêmes caractéristiques que la protéine native), que quantitatif (protéines produites en quantités importantes) (Webb et al., 1989). Dans le cas du B19, le système baculovirus a permis de se libérer des contraintes qui ont longtemps entravé les recherches portant sur le virus, en l'occurrence son érythrotropisme, ainsi que la difficulté de son obtention en quantités suffisantes. En plus d'offrir un accès vers une meilleure étude du virus, appuyé par le fait que les VLPs obtenues sont similaires aux particules natives, aussi bien au point de vue structural, antigénique qu'immunologique (Brown et al., 1991 ; Kajigaya et al, 1991), ce système met à notre disposition la structure du virus qui, en plus de son rôle de protection du génome viral, porte les secrets d'une partie non négligeable de l'histoire de l'infection : la capside.

En effet, comprendre la capside virale, en particulier son mécanisme d'assemblage, constitue, outre une satisfaction de la curiosité du scientifique, une ouverture vers une lutte plus efficace contre le virus. Plusieurs études portant sur ce sujet et basées sur des analyses mutationnelles ont été réalisées sur certains parvovirus, notamment le MVM et le CPV (Lombardo et al., 2000 ; Lombardo et al., 2002; Yuan et Parrish, 2001). Ces études avaient pour objectif d'établir l'ordre et la forme dans lesquels les protéines de structure atteignent le noyau pour former la capside virale. Le virus B19, dont la protéine VP2 présente des similarités de séquence avec celle des autres parvovirus et paradoxalement, des différences structurales importantes avec celle de ces mêmes virus, ne pouvait échapper à des études comparables.

En considérant les deux points évoqués précédemment, nous avons entrepris de muter en alanine, quatre acides aminés conservés à travers plusieurs parvovirus et occupant une position stratégique dans la protéine VP2 du virus B19 (*figure12*), et d'observer l'effet de ces mutations sur la formation des VLPs. Nous avons également jugé intéressant de vérifier la localisation cellulaire de VP2, sachant qu'une fois formées, les capsides sont censées se retrouver dans le noyau.

Après incorporation des mutations, séparément, dans le gène VP2, l'expression de la protéine d'intérêt, mutée ou non, a été réalisée dans le système baculovirus.

Une analyse de culots de cellules High Five infectées, par immunobuvardage de type Western en utilisant un anticorps monoclonal spécifique des protéines de capsidite du B19 (R92F6), a permis de confirmer que les protéines recombinantes sont bien exprimées (*figure 17*). En effet, une bande à la hauteur espérée (58 kDa) a été observée dans les différents cas.

Afin de confirmer les résultats obtenus par immunobuvardage de type Western, une immunofluorescence indirecte sur des cellules High Five infectées avec le stock P1 a également été réalisée, en employant le même anticorps que précédemment (R92F6). L'expression des protéines recombinantes VP2, sauvage ou mutée, s'est révélée positive (*figure18*).

Une fois que nous nous sommes assurés de la présence des protéines recombinantes, dans le but de rendre les résultats finaux comparables, l'infection des cellules High Five avec les différents stocks viraux, dans la dernière étape du protocole d'expression (expression des protéines à plus grande échelle), a été effectuée dans les mêmes conditions en terme de MOI, de nombre de cellules infectées et de temps d'infection.

Une précipitation au sulfate d'ammonium a servi à la purification des différentes capsides recombinantes. L'immunobuvardage de type Western avec l'anticorps R92F6,

réalisé sur les fractions résultant de la précipitation a révélé un éventuel auto-assemblage uniquement dans le cas de la VP2 non mutée (VP2wt), ainsi que la VP2 mutée au niveau de l'acide aminé T146 (VP2T), confirmant que la présence des autres composantes virales n'est pas nécessaire pour l'autoassemblage de VP2 (*figure 19*). Par ailleurs, une différence considérable dans les quantités de VLPs précipitées dans les deux cas est à noter (*figure 19*).

Pour confirmer la présence de VLPs, nous avons procédé à l'observation des fractions de précipitation, en microscopie électronique. Tel que le démontre la *figure 20*, les deux cas VP2wt et VP2T présentent des particules vides très ressemblantes entre elles et au virus natif.

Les deux derniers résultats obtenus montrent que les mutations VP2D, VP2N et VP2W altèrent la formation de la capsid, puisque des particules recombinantes ne sont formées dans aucun de ces trois cas.

La position de l'asparagine (N) 93 à l'intérieur du monomère VP2 (*figure 12-A*) nous conduit à mettre un lien entre sa mutation et l'inachèvement d'un bon repliement de la protéine, lequel aurait empêché la suite des étapes aboutissant à la formation de la capsid entière.

L'acide aspartique 154 et le tryptophane 503 concerneraient davantage un trimère de VP2. En effet, en observant la position de ces deux résidus au sein d'une telle structure, nous nous apercevons que le premier se situe à la jonction entre les sous-unités VP2 (*figure 12-C*), quant au second, il orne la périphérie du trimère pour s'impliquer dans la liaison trimère-trimère (*figure 12-D*). Une explication au fait que la mutation de ces acides aminés empêche la formation de VLPs est que les trimères de VP2 constituent des entités indispensables à l'assemblage de la capsid virale, tel que le laissait prédire la structure T=1 de la capsid des parvovirus, ainsi que la grande stabilité des trimères comparés aux autres intermédiaires structuraux possibles (dimères et pentamères) (Xie et Chapman, 1996).

Le cas de la thréonine 146 est particulier, dans la mesure où des VPLs sont obtenues, mais dans des proportions inférieures à celles du type sauvage (bien que les expériences aient été faites dans les mêmes conditions). Il est possible que les particules formées présente une instabilité structurale à laquelle certaines résistent et d'autres cèdent. Une représentation d'un pentamère VP2 montre bien que le résidu en question entoure le canal cylindrique de la capsidie (*figure 12-B*). Cette région est composée essentiellement d'acides aminés de stabilité inférieure (*figure 11*), ce qui explique l'effet moindre de la mutation de T146 comparé à celui de la mutation de D146 et W503, lesquels appartiennent à des régions riches en résidus de grande stabilité (*figure 11*).

L'analyse de la localisation de VP2 dans les cellules High Five par microscopie confocale en utilisant l'anticorps anti-B19, n'a révélé aucune différence phénotypique entre les mutants et le type sauvage : la protéine se trouvait autant dans le cytoplasme que dans le noyau (*figure 21*). Il est, cependant, à noter que dans le cas du type sauvage, une localisation nucléaire était la plus envisageable (Réf : partie II du présent chapitre). Il n'en a pas été ainsi, possiblement en raison d'une observation trop tardive des cellules infectées. En effet, ces dernières, après un temps d'infection de 72 heures, ont peut-être déjà atteint l'étape d'exportation des VLPs du noyau vers le cytoplasme. Une analyse précoce (24 heures post-infection) des cellules infectées répondrait à cette hypothèse. Une autre explication à prendre en compte réside dans les différences liées aux mécanismes de transport nucléaire des cellules d'insecte et des cellules de mammifère, sachant que ces dernières constituent l'environnement « naturel » pour l'expression des protéines du virus. Ces différences pourraient concerner la sélectivité de l'importation via les signaux de localisation nucléaires (NLS) et/ou de l'exportation via les signaux d'exportation nucléaire (AES). Il est également possible que le taux d'expression de VP2 élevé dans le système d'expression employé, comparé aux cellules de mammifère, soit à l'origine d'une répartition générale dans les cellules. D'autre part, bien que de nombreuses protéines exprimées dans des cellules d'insectes soient correctement phosphorylées, l'état de phosphorylation d'un certain nombre d'autres protéines s'est révélé moindre ou différent comparé à celui obtenu lorsque ces mêmes protéines sont

exprimées dans les cellules de mammifère (de Carvalho et al., 1996; Jiang et al., 1997). Ceci pourrait expliquer la différence de la répartition de VP2 dans les deux systèmes cellulaires, d'autant plus que la qualité de phosphorylation d'une protéine peut avoir un effet sur son transport nucléaire. Par ailleurs, l'absence de la deuxième protéine de structure VP1 est également à considérer pour commenter le résultat obtenu. En effet, le rôle de cette protéine dans le transport de VP2 dans le noyau a été rapporté par plusieurs équipes (Lombardo et al., 2000; Ruffing, Zentgraf, Kleinschmidt, 1992; Gilbert et al., 2005).

## **II. Expression VP2 mutée ou non dans les cellules de mammifères**

Les résultats précédents liés à la distribution cellulaire de VP2 n'ayant fourni aucune information quant à la façon dont les mutants entraveraient l'assemblage de la capside, la présente partie du projet réalisée sur les cellules de mammifère, s'est avérée cruciale.

En effet, dans un tel environnement impliquant l'utilisation du clone infectieux B194244 $\Delta$ , tous les éléments sont réunis pour le déroulement d'un cycle infectieux normal. Par conséquent, tout résultat divergeant de celui du type sauvage nous mènerait à des considérations autres que celles citées dans le cas des cellules d'insecte et qui seraient directement liées aux mutations.

Tel était notre objectif. Cependant, après incorporation des mutations, séparément, dans le clone infectieux, puis transfection de cellules Cos-7 avec les différents clones, l'expression de la protéine VP2 n'a pu être observée que dans le cas du type sauvage B194244 $\Delta$ . En effet, la fluorescence n'était émise que par les cellules transfectées avec le clone infectieux non-muté, alors qu'elle était inexistante dans les autres cas (*figure 22*).

La mise en cause de l'éventuelle inefficacité de la transfection, ou encore de l'impureté des clones dans le cas des mutants sont à exclure, puisque nous nous sommes assurés de réaliser toutes les expériences en même temps, avec les mêmes techniques,

dans les mêmes conditions et plusieurs fois. Le résultat, lorsqu'il était positif, ne concernait que le type sauvage.

En raison de l'instabilité des structures en épingle à cheveux présentes aux extrémités du génome du B19, il n'était pas possible d'utiliser le clone infectieux comme matrice pour introduire les mutations. Il a fallu donc, pour la construction des mutants, recourir à différentes étapes incluant des digestions avec des enzymes de restriction, le découpage des bandes contenant le fragment d'ADN d'intérêt à partir du gel d'agarose, la purification et la ligation. Ces étapes constituent les éléments qui distinguent les clones mutés du clone de type sauvage. Il est donc possible qu'au cours de ces dernières, la structure de base du clone infectieux ait été altérée.

L'absence d'expression de VP2 dans le cas des mutants peut également être expliquée en considérant un point lié directement aux mutations. En effet, nos choix concernant ces dernières ont possiblement coïncidé avec des zones « vitales » pour l'expression virale.

L'adoption d'autres stratégies de clonage nous permettrait de vérifier laquelle des deux hypothèses est la plus plausible.

Suite à l'observation en microscopie confocale des cellules Cos-7 transfectées avec le clone infectieux B19 non muté, nous avons pu constater que la localisation de la protéine VP2 et probablement des capsides virales, est nucléaire tel que l'illustre la *figure 22*. L'inexistence totale de fluorescence dans le cytoplasme laisse penser que l'assemblage viral a lieu dans le noyau. La présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) à la surface de la VP2 monomérique (Kaufmann, Simpson et Rossman, 2004) expliquerait la possibilité de ce voyage vers ce compartiment. Par ailleurs, l'inaccessibilité de ce signal NLS lorsque la VP2 forme la capside (Kaufmann, Simpson et Rossman, 2004) appuierait le fait que l'assemblage ne semble pas avoir lieu dans le cytoplasme, sans compter qu'en considérant le diamètre de la capside du B19 et celle des complexes de pore nucléaire (NPC), le passage à travers ces derniers est improbable. Ce



résultat rejoint celui obtenu par des études menées sur d'autres parvovirus (Hoque et al., 1999; Lombardo et al., 2000, Lombardo et al., 2002).

### **III. Production d'anticorps recombinants scFv dirigée contre les capsides recombinantes du B19 par la technique du phage display**

Les banques d'anticorps Tomlinson I et J, nous sont parvenues pour servir à d'autres fins que celle décrite dans ce chapitre. Cependant, nous nous sommes retrouvés avec à notre disposition des outils de travail nouveaux, attrayants et complémentaires : la technique du phage display, ainsi qu'une cible originale pour la tester (les VLPS-B19). Bien qu'il existe des anticorps anti-B19 efficaces, il reste, néanmoins, idéal de pouvoir produire soi-même un anticorps de même efficacité et à moindres coûts.

Après quelques essais de production de scFv dirigés contre les VLPs du B19, dont les premiers ont essuyé un échec, nous sommes parvenus à isoler un clone positif.

Ce dernier, après avoir été produit sous forme soluble a servi comme anticorps primaire dans un test ELISA lequel a bien mis en évidence la dose-dépendance de la diminution de la densité optique et a ainsi permis de confirmer la spécificité du clone scFv obtenu vis-à-vis des VLPs du B19 (*figure 23*). En immunobuvardage de type Western, la reconnaissance de la protéine VP2, par le clone scFv en question s'est en revanche révélé négative. En considérant ces deux résultats dont l'un concerne la détection de VP2 formant la capside vide (ELISA) et l'autre, la VP2 sous sa forme linéaire (immunobuvardage de type Western), l'idée que le scFv isolé reconnaît un site conformationnel devient plausible.

Pour des fins de recherche fondamentale, nous avons pu démontrer l'efficacité du scFv seulement dans une seule technique (ELISA). Il serait intéressant de faire les tests nécessaires, afin d'élargir son cercle d'utilisation, notamment en immunofluorescence. Quant aux applications diagnostique ou thérapeutique du scFv obtenu, il sera évidemment indispensable de tester sa spécificité pour la particule virale native.

## *Conclusion*

Comprendre le mécanisme de l'assemblage de la capsidie du B19V pourrait constituer un moyen de lutte contre ce dernier. Cependant, très peu d'informations sont disponibles sur ce stade du cycle d'infection du virus.

Nos résultats montrent que la conservation de certains acides aminés de la protéine de structure VP2 à travers les parvovirus n'est pas fortuite et que ces résidus ont probablement une importance structurale. Par ailleurs, nous constatons, en considérant la position de chaque résidu muté, qu'un passage par des intermédiaires structuraux (trimères) précède l'aboutissement à la forme finale de la capsidie virale.

Dans ce projet, nous sommes également parvenus à produire un anticorps recombinant spécifique des capsides recombinantes du B19V. Un tel résultat est très prometteur, autant d'un point de vue technique (utilisation en recherche) que thérapeutique (remplacement des immunoglobulines humaines utilisées actuellement comme traitement curatif).

## ***Références bibliographiques***

Abkowitz, J. L., K. E. Brown, R. W. Wood, N. L. Kovach, S. W. Green and N. S. Young (1997). "Clinical relevance of parvovirus B19 as a cause of anemia in patients with human immunodeficiency virus infection." *J Infect Dis* 176(1): 269-73.

Agbandje, M., S. Kajigaya, R. McKenna, N. S. Young and M. G. Rossmann (1994). "The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution." *Virology* 203(1): 106-15.

Agbandje-McKenna, M., A. L. Llamas-Saiz, F. Wang, P. Tattersall and M. G. Rossmann (1998). "Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice." *Structure* 6(11): 1369-81.

Anderson, L. J. (1987). "Role of parvovirus B19 in human disease." *Pediatr Infect Dis J* 6(8): 711-8.

Anderson, L. J., C. Tsou, R. A. Parker, T. L. Chorba, H. Wulff, P. Tattersall and P. P. Mortimer (1986). "Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay." *J Clin Microbiol* 24(4): 522-6.

Anderson, M. J., P. G. Higgins, L. R. Davis, J. S. Willman, S. E. Jones, I. M. Kidd, J. R. Pattison and D. A. Tyrrell (1985). "Experimental parvoviral infection in humans." *J Infect Dis* 152(2): 257-65.

Anderson, M. J., S. E. Jones, S. P. Fisher-Hoch, E. Lewis, S. M. Hall, C. L. Bartlett, B. J. Cohen, P. P. Mortimer and M. S. Pereira (1983). "Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)?" *Lancet* i(8338): 1378.

Anderson, M. J., E. Lewis, I. M. Kidd, S. M. Hall and B. J. Cohen (1984). "An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection." *J Hyg (Lond)* 93(1): 85-93.

Azzi, A., S. Ciappi, K. Zakvrzewska, M. Morfini, G. Mariani and P. M. Mannucci (1992). "Human parvovirus B19 infection in hemophiliacs first infused with two high-purity, virally attenuated factor VIII concentrates." *Am J Hematol* 39(3): 228-30.

Ballou, W. R., J. L. Reed, W. Noble, N. S. Young and S. Koenig (2003). "Safety and immunogenicity of a recombinant parvovirus B19 vaccine formulated with MF59C.1." *J Infect Dis* 187(4): 675-8.

Bansal, G. P., J. A. Hatfield, F. E. Dunn, A. A. Kramer, F. Brady, C. H. Riggin, M. S. Collett, K. Yoshimoto, S. Kajigaya and N. S. Young (1993). "Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus." *J Infect Dis* 167(5): 1034-44.

Barah, F., P. J. Valley, M. L. Chiswick, G. M. Cleator and J. R. Kerr (2001). "Association of human parvovirus B19 infection with acute meningoencephalitis." *Lancet* 358(9283): 729-30.

Barbas, C. F., 3rd and D. R. Burton (1996). "Selection and evolution of high-affinity human anti-viral antibodies." *Trends Biotechnol* 14(7): 230-4.

Bartolomei Corsi, O., A. Azzi, M. Morfini, R. Fanci and P. Rossi Ferrini (1988). "Human parvovirus infection in haemophiliacs first infused with treated clotting factor concentrates." *J Med Virol* 25(2): 165-70.

Bataille, R., B. Barlogie, Z. Y. Lu, J. F. Rossi, T. Lavabre-Bertrand, T. Beck, J. Wijdenes, J. Brochier and B. Klein (1995). "Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma." *Blood* 86(2): 685-91.

Berns, K. I. (1990). "Parvovirus replication." *Microbiol Rev* 54(3): 316-29.

Bertolotti-Ciarlet, A., L. J. White, R. Chen, B. V. Prasad and M. K. Estes (2002). "Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles." *J Virol* 76(8): 4044-55.

Blazek, D., V. Celer, I. Navratilova and P. Skladal (2004). "Generation and characterization of single-chain antibody fragments specific against transmembrane envelope glycoprotein gp46 of maedi-visna virus." *J Virol Methods* 115(1): 83-92.

Blumel, J., I. Schmidt, W. Effenberger, H. Seitz, H. Willkommen, H. H. Brackmann, J. Lower and A. M. Eis-Hubinger (2002). "Parvovirus B19 transmission by heat-treated clotting factor concentrates." *Transfusion* 42(11): 1473-81.

Blundell, M. C. and C. R. Astell (1989). "A GC-box motif upstream of the B19 parvovirus unique promoter is important for in vitro transcription." *J Virol* 63(11): 4814-23.

Blundell, M. C., C. Beard and C. R. Astell (1987). "In vitro identification of a B19 parvovirus promoter." *Virology* 157(2): 534-8.

Brown, C. S., T. Jensen, R. H. Melen, W. Puijk, K. Sugamura, H. Sato and W. J. Spaan (1992). "Localization of an immunodominant domain on baculovirus-produced parvovirus B19 capsids: correlation to a major surface region on the native virus particle." *J Virol* 66(12): 6989-96.

Brown, C. S., M. M. Salimans, M. H. Noteborn and H. T. Weiland (1990). "Antigenic parvovirus B19 coat proteins VP1 and VP2 produced in large quantities in a baculovirus expression system." *Virus Res* 15(3): 197-211.

Brown, C. S., J. W. Van Lent, J. M. Vlak and W. J. Spaan (1991). "Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins." *J Virol* 65(5): 2702-6.

Brown, C. S., J. W. Van Lent, J. M. Vlak and W. J. Spaan (1991). "Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins." *J Virol* 65(5): 2702-6.

Brown, K. E., S. M. Anderson and N. S. Young (1993). "Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus." *Science* 262(5130): 114-7.

Brown, K. E., J. R. Hibbs, G. Gallinella, S. M. Anderson, E. D. Lehman, P. McCarthy and N. S. Young (1994). "Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen)." *N Engl J Med* 330(17): 1192-6.

Brown, K. E. and N. S. Young (1997). "Human parvovirus B19 infections in infants and children." *Adv Pediatr Infect Dis* 13: 101-26.

Brown, T., A. Anand, L. D. Ritchie, J. P. Clewley and T. M. Reid (1984). "Intrauterine parvovirus infection associated with hydrops fetalis." *Lancet* 2(8410): 1033-4.

Caillet-Fauquet, P., M. Di Giambattista, M. L. Draps, F. Sandras, T. Branckaert, Y. de Launoit and R. Laub (2004). "Continuous-flow UVC irradiation: a new, effective, protein activity-preserving system for inactivating bacteria and viruses, including erythrovirus B19." *J Virol Methods* 118(2): 131-9.

Casal, J. I. (1999). "Use of parvovirus-like particles for vaccination and induction of multiple immune responses." *Biotechnol Appl Biochem* 29 ( Pt 2): 141-50.

Cassinotti, P., G. Siegl, B. A. Michel and P. Bruhlmann (1998). "Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin." *J Med Virol* 56(3): 199-204.

Cavallo, R., C. Merlino, D. Re, C. Bollero, M. Bergallo, D. Lembo, T. Musso, G. Leonardi, G. P. Segoloni and A. N. Ponzi (2003). "B19 virus infection in renal transplant recipients." *J Clin Virol* 26(3): 361-8.

Chapman, M. S. and M. G. Rossmann (1993). "Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses." *Virology* 194(2): 491-508.

Chapman, M. S. and M. G. Rossmann (1995). "Single-stranded DNA-protein interactions in canine parvovirus." *Structure* 3(2): 151-62.

Charpilienne, A., M. Nejmeddine, M. Berois, N. Perez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan and J. Cohen (2001). "Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells." *J Biol Chem* 276(31): 29361-7.

- Chernak, E., G. Dubin, D. Henry, S. J. Naides, R. L. Hodinka, R. R. MacGregor and H. M. Friedman (1995). "Infection due to parvovirus B19 in patients infected with human immunodeficiency virus." *Clin Infect Dis* 20(1): 170-3.
- Chipman, P. R., M. Agbandje-McKenna, S. Kajigaya, K. E. Brown, N. S. Young, T. S. Baker and M. G. Rossmann (1996). "Cryo-electron microscopy studies of empty capsids of human parvovirus B19 complexed with its cellular receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15): 7502-6.
- Chorba, T., P. Coccia, R. C. Holman, P. Tattersall, L. J. Anderson, J. Sudman, N. S. Young, E. Kurczynski, U. M. Saarinen, R. Moir and et al. (1986). "The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease)." *J Infect Dis* 154(3): 383-93.
- Christensen, J., S. Alexandersen, B. Bloch, B. Aasted and A. Uttenthal (1994). "Production of mink enteritis parvovirus empty capsids by expression in a baculovirus vector system: a recombinant vaccine for mink enteritis parvovirus in mink." *J Gen Virol* 75 ( Pt 1): 149-55.
- Christensen, J., T. Storgaard, B. Bloch, S. Alexandersen and B. Aasted (1993). "Expression of Aleutian mink disease parvovirus proteins in a baculovirus vector system." *J Virol* 67(1): 229-38.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, A. D. Griffiths and G. Winter (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." *Nature* 352(6336): 624-8.
- Clarke, J. and J. D. Lee (2003). "Primary human parvovirus B19 infection in an HIV infected patient on highly active antiretroviral therapy." *Sex Transm Infect* 79(4): 336.
- Clewley, J. P. (1984). "Biochemical characterization of a human parvovirus." *J Gen Virol* 65 ( Pt 1): 241-5.
- Clewley, J. P. (1985). "Detection of human parvovirus using a molecularly cloned probe." *J Med Virol* 15(2): 173-81.
- Clewley, J. P., B. J. Cohen and A. M. Field (1987). "Detection of parvovirus B19 DNA, antigen, and particles in the human fetus." *J Med Virol* 23(4): 367-76.
- Cohen, B. J. (1994). "Human parvovirus B19 infection in Kawasaki disease." *Lancet* 344(8914): 59.
- Cohen, B. J. and M. M. Buckley (1988). "The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in England and Wales." *J Med Microbiol* 25(2): 151-3.
- Cooling, L. L., T. A. Koerner and S. J. Naides (1995). "Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19." *J Infect Dis* 172(5): 1198-205.



Corcoran, A. and S. Doyle (2004). "Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19." *J Med Microbiol* 53(Pt 6): 459-75.

Corcoran, A., S. Doyle, D. Waldron, A. Nicholson and B. P. Mahon (2000). "Impaired gamma interferon responses against parvovirus B19 by recently infected children." *J Virol* 74(21): 9903-10.

Corcoran, A., B. P. Mahon, P. McParland, A. Davoren and S. Doyle (2003). "Ex vivo cytokine responses against parvovirus B19 antigens in previously infected pregnant women." *J Med Virol* 70(3): 475-80.

Cossart, Y. E., A. M. Field, B. Cant and D. Widdows (1975). "Parvovirus-like particles in human sera." *Lancet* 1(7898): 72-3.

Cotmore, S. F., V. C. McKie, L. J. Anderson, C. R. Astell and P. Tattersall (1986). "Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments." *J Virol* 60(2): 548-57.

Cotmore, S. F. and P. Tattersall (1984). "Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome." *Science* 226(4679): 1161-5.

de Carvalho, M. G., A. L. McCormack, E. Olson, F. Ghomashchi, M. H. Gelb, J. R. Yates, 3rd and C. C. Leslie (1996). "Identification of phosphorylation sites of human 85-kDa cytosolic phospholipase A2 expressed in insect cells and present in human monocytes." *J Biol Chem* 271(12): 6987-97.

de Freitas, R. B., D. Wong, F. Boswell, M. F. de Miranda, A. C. Linhares, J. Shirley and U. Desselberger (1990). "Prevalence of human parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote rural areas in northern Brazil." *J Med Virol* 32(4): 203-8.

Deiss, V., J. D. Tratschin, M. Weitz and G. Siegl (1990). "Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini." *Virology* 175(1): 247-54.

Dettmeyer, R., R. Kandolf, A. Baasner, S. Banaschak, A. M. Eis-Hubinger and B. Madea (2003). "Fatal parvovirus B19 myocarditis in an 8-year-old boy." *J Forensic Sci* 48(1): 183-6.

Dieck, D., R. L. Schild, M. Hansmann and A. M. Eis-Hubinger (1999). "Prenatal diagnosis of congenital parvovirus B19 infection: value of serological and PCR techniques in maternal and fetal serum." *Prenat Diagn* 19(12): 1119-23.

Dijkmans, B. A., A. M. van Elsacker-Niele, M. M. Salimans, G. A. van Albada-Kuipers, E. de Vries and H. T. Weiland (1988). "Human parvovirus B19 DNA in synovial fluid." *Arthritis Rheum* 31(2): 279-81.

Doerig, C., P. Beard and B. Hirt (1987). "A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo." *Virology* 157(2): 539-42.

Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti and P. Beard (1990). "Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription." *J Virol* 64(1): 387-96.

Dorsch, S., G. Liebisch, B. Kaufmann, P. von Landenberg, J. H. Hoffmann, W. Drobnik and S. Modrow (2002). "The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity." *J Virol* 76(4): 2014-8.

Doyle, S., S. Kerr, G. O'Keeffe, D. O'Carroll, P. Daly and C. Kilty (2000). "Detection of parvovirus B19 IgM by antibody capture enzyme immunoassay: receiver operating characteristic analysis." *J Virol Methods* 90(2): 143-52.

Duncan, J. R., C. B. Potter, M. D. Cappellini, J. B. Kurtz, M. J. Anderson and D. J. Weatherall (1983). "Aplastic crisis due to parvovirus infection in pyruvate kinase deficiency." *Lancet* 2(8340): 14-6.

Eis-Hubinger, A. M., U. Reber, T. Abdul-Nour, U. Glatzel, H. Lauschke and U. Putz (2001). "Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults." *J Med Virol* 65(2): 395-401.

El-Mahallawy, H. A., T. Mansour, S. E. El-Din, M. Hafez and S. Abd-el-Latif (2004). "Parvovirus B19 infection as a cause of anemia in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients during maintenance chemotherapy." *J Pediatr Hematol Oncol* 26(7): 403-6.

Ennis, O., A. Corcoran, K. Kavanagh, B. P. Mahon and S. Doyle (2001). "Baculovirus expression of parvovirus B19 (B19V) NS1: utility in confirming recent infection." *J Clin Virol* 22(1): 55-60.

Erdman, D. D., M. J. Usher, C. Tsou, E. O. Caul, G. W. Gary, S. Kajigaya, N. S. Young and L. J. Anderson (1991). "Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum." *J Med Virol* 35(2): 110-5.

Farr, G. A. and P. Tattersall (2004). "A conserved leucine that constricts the pore through the capsid fivefold cylinder plays a central role in parvoviral infection." *Virology* 323(2): 243-56.

Feldherr, C. M., E. Kallenbach and N. Schultz (1984). "Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes." *J Cell Biol* 99(6): 2216-22.

Ferguson, P. J., F. T. Saulsbury, S. F. Dowell, T. J. Torok, D. D. Erdman and L. J. Anderson (1996). "Prevalence of human parvovirus B19 infection in children with Henoch-Schonlein purpura." *Arthritis Rheum* 39(5): 880-1.

Finkel, T. H., T. J. Torok, P. J. Ferguson, E. L. Durigon, S. R. Zaki, D. Y. Leung, R. J. Harbeck, E. W. Gelfand, F. T. Saulsbury, J. R. Hollister and et al. (1994). "Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent?" *Lancet* 343(8908): 1255-8.

Flego, M., P. Di Bonito, A. Ascione, S. Zamboni, A. Carattoli, F. Grasso, A. Cassone and M. Cianfriglia (2005). "Generation of human antibody fragments recognizing distinct epitopes of the nucleocapsid (N) SARS-CoV protein using a phage display approach." *BMC Infect Dis* 5: 73.

Franssila, R., K. Hokynar and K. Hedman (2001). "T helper cell-mediated in vitro responses of recently and remotely infected subjects to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus b19." *J Infect Dis* 183(5): 805-9.

French, T. J., J. J. Marshall and P. Roy (1990). "Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins." *J Virol* 64(12): 5695-700.

Frickhofen, N., J. L. Abkowitz, M. Safford, J. M. Berry, J. Antunez-de-Mayolo, A. Astrow, R. Cohen, I. Halperin, L. King, D. Mintzer and et al. (1990). "Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS." *Ann Intern Med* 113(12): 926-33.

Fryer, J. F., A. Kapoor, P. D. Minor, E. Delwart and S. A. Baylis (2006). "Novel parvovirus and related variant in human plasma." *Emerg Infect Dis* 12(1): 151-4.

Fukada, K., K. Matumoto, F. Takakura, M. Yamaki, H. Sato, K. Okochi and Y. Maeda (2000). "Four putative subtypes of human parvovirus B19 based on amino acid polymorphism in the C-terminal region of non-structural protein." *J Med Virol* 62(1): 60-9.

Gaboulaud, V., A. Parquet, C. Tahiri, S. Claeysens, V. Potard, A. Faradji, J. Peynet and D. Costagliola (2002). "Prevalence of IgG antibodies to human parvovirus B19 in haemophilia children treated with recombinant factor (F)VIII only or with at least one plasma-derived FVIII or FIX concentrate: results from the French haemophilia cohort." *Br J Haematol* 116(2): 383-9.

Gallinella, G., E. Manaresi, E. Zuffi, S. Venturoli, L. Bonsi, G. P. Bagnara, M. Musiani and M. Zerbini (2000). "Different patterns of restriction to B19 parvovirus replication in human blast cell lines." *Virology* 278(2): 361-7.

Gallinella, G., S. Venturoli, G. Gentilomi, M. Musiani and M. Zerbini (1995). "Extent of sequence variability in a genomic region coding for capsid proteins of B19 parvovirus." *Arch Virol* 140(6): 1119-25.

Garcia-Tapia, A. M., C. Fernandez-Gutierrez del Alamo, J. A. Giron, J. Mira, F. de la Rubia, A. Martinez-Rodriguez, M. V. Martin-Reina, R. Lopez-Caparros, R. Caliz, M. S. Caballero and et al. (1995). "Spectrum of parvovirus B19 infection: analysis of an outbreak of 43 cases in Cadiz, Spain." *Clin Infect Dis* 21(6): 1424-30.

Gentilomi, G., M. Zerbini, M. Musiani, G. Gallinella, D. Gibellini, S. Venturoli, M. C. Re, S. Pileri, C. Finelli and M. La Placa (1993). "In situ detection of B19 DNA in bone marrow of immunodeficient patients using a digoxigenin-labelled probe." *Mol Cell Probes* 7(1): 19-24.

Gilbert, L., J. Toivola, E. Lehtomaki, L. Donaldson, P. Kapyla, M. Vuento and C. Oker-Blom (2004). "Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells." *Biochem Biophys Res Commun* 313(4): 878-87.

Goosen, M. F. (1991). "Large-scale insect cell culture: methods, applications and products." *Curr Opin Biotechnol* 2(3): 365-9.

Gratacos, E., P. J. Torres, J. Vidal, E. Antolin, J. Costa, M. T. Jimenez de Anta, V. Cararach, P. L. Alonso and A. Fortuny (1995). "The incidence of human parvovirus B19 infection during pregnancy and its impact on perinatal outcome." *J Infect Dis* 171(5): 1360-3.

Gray, J. J., B. J. Cohen and U. Desselberger (1993). "Detection of human parvovirus B19-specific IgM and IgG antibodies using a recombinant viral VP1 antigen expressed in insect cells and estimation of time of infection by testing for antibody avidity." *J Virol Methods* 44(1): 11-23.

Hanada, T., K. Koike, T. Takeya, T. Nagasawa, Y. Matsunaga and H. Takita (1988). "Human parvovirus B19-induced transient pancytopenia in a child with hereditary spherocytosis." *Br J Haematol* 70(1): 113-5.

Hansman, G. S., K. Katayama, T. Oka, K. Natori and N. Takeda (2005). "Mutational study of sapovirus expression in insect cells." *Virol J* 2: 13.

Harger, J. H., S. P. Adler, W. C. Koch and G. F. Harger (1998). "Prospective evaluation of 618 pregnant women exposed to parvovirus B19: risks and symptoms." *Obstet Gynecol* 91(3): 413-20.

Heegaard, E. D. and K. E. Brown (2002). "Human parvovirus B19." *Clin Microbiol Rev* 15(3): 485-505.

Heegaard, E. D. and A. Hornsleth (1995). "Parvovirus: the expanding spectrum of disease." *Acta Paediatr* 84(2): 109-17.

Heegaard, E. D., I. Panum Jensen and J. Christensen (2001). "Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9." *J Med Virol* 65(2): 362-7.

Heegaard, E. D., B. L. Petersen, C. J. Heilmann and A. Hornsleth (2002). "Prevalence of parvovirus B19 and parvovirus V9 DNA and antibodies in paired bone marrow and serum samples from healthy individuals." *J Clin Microbiol* 40(3): 933-6.

Heegaard, E. D. and E. B. Taaning (2002). "Parvovirus B19 and parvovirus V9 are not associated with Henoch-Schonlein purpura in children." *Pediatr Infect Dis J* 21(1): 31-4.

Hemauer, A., A. Gigler, R. Gareus, A. Reichle, H. Wolf and S. Modrow (1999). "Infection of apheresis cells by parvovirus B19." *J Gen Virol* 80 ( Pt 3): 627-30.

Hemauer, A., A. Gigler, K. Searle, K. Beckenlehner, U. Raab, K. Broliden, H. Wolf, G. Enders and S. Modrow (2000). "Seroprevalence of parvovirus B19 NS1-specific IgG in B19-infected and uninfected individuals and in infected pregnant women." *J Med Virol* 60(1): 48-55.

Hemauer, A., A. von Poblitzki, A. Gigler, P. Cassinotti, G. Siegl, H. Wolf and S. Modrow (1996). "Sequence variability among different parvovirus B19 isolates." *J Gen Virol* 77 ( Pt 8): 1781-5.

Henriques, I., F. Monteiro, E. Meireles, A. Cruz, G. Tavares, M. Ferreira and F. Araujo (2005). "Prevalence of Parvovirus B19 and Hepatitis A virus in Portuguese blood donors." *Transfus Apher Sci* 33(3): 305-9.

Hermonat, P. L. (1989). "The adeno-associated virus Rep78 gene inhibits cellular transformation induced by bovine papillomavirus." *Virology* 172(1): 253-61.

Hernando, E., A. L. Llamas-Saiz, C. Foces-Foces, R. McKenna, I. Portman, M. Agbandje-McKenna and J. M. Almendral (2000). "Biochemical and physical characterization of parvovirus minute virus of mice virus-like particles." *Virology* 267(2): 299-309.

Hokynar, K., J. Brunstein, M. Soderlund-Venermo, O. Kiviluoto, E. K. Partio, Y. Konttinen and K. Hedman (2000). "Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue." *J Gen Virol* 81(Pt 4): 1017-25.

Hokynar, K., P. Norja, H. Laitinen, P. Palomaki, A. Garbarg-Chenon, A. Ranki, K. Hedman and M. Soderlund-Venermo (2004). "Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests." *J Clin Microbiol* 42(5): 2013-9.

Hokynar, K., M. Soderlund-Venermo, M. Pesonen, A. Ranki, O. Kiviluoto, E. K. Partio and K. Hedman (2002). "A new parvovirus genotype persistent in human skin." *Virology* 302(2): 224-8.

Hoogenboom, H. R. and G. Winter (1992). "By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro." *J Mol Biol* 227(2): 381-8.

Hoque, M., N. Shimizu, K. Ishizu, H. Yajima, F. Arisaka, K. Suzuki, H. Watanabe and H. Handa (1999). "Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus." *Biochem Biophys Res Commun* 266(2): 371-6.

Hunter, L. A. and R. J. Samulski (1992). "Colocalization of adeno-associated virus Rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells." *J Virol* 66(1): 317-24.

Jiang, G., L. Nepomuceno, Q. Yang and F. M. Sladek (1997). "Serine/threonine phosphorylation of orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4." *Arch Biochem Biophys* 340(1): 1-9.

Jones, L. P., D. D. Erdman and L. J. Anderson (1999). "Prevalence of antibodies to human parvovirus B19 nonstructural protein in persons with various clinical outcomes following B19 infection." *J Infect Dis* 180(2): 500-4.

Jordan, J., B. Tiangco, J. Kiss and W. Koch (1998). "Human parvovirus B19: prevalence of viral DNA in volunteer blood donors and clinical outcomes of transfusion recipients." *Vox Sang* 75(2): 97-102.

Jordan, J. A. (2000). "Comparison of a baculovirus-based VP2 enzyme immunoassay (EIA) to an Escherichia coli-based VP1 EIA for detection of human parvovirus B19 immunoglobulin M and immunoglobulin G in sera of pregnant women." *J Clin Microbiol* 38(4): 1472-5.

Jordan, J. A. and J. A. DeLoia (1999). "Globoside expression within the human placenta." *Placenta* 20(1): 103-8.

Jostock, T., M. Vanhove, E. Brepoels, R. Van Gool, M. Daukandt, A. Wehnert, R. Van Hegelsom, D. Dransfield, D. Sexton, M. Devlin, A. Ley, H. Hoogenboom and J. Mullberg (2004). "Rapid generation of functional human IgG antibodies derived from Fab-on-phage display libraries." *J Immunol Methods* 289(1-2): 65-80.

Kajigaya, S., H. Fujii, A. Field, S. Anderson, S. Rosenfeld, L. J. Anderson, T. Shimada and N. S. Young (1991). "Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4646-50.

Kajigaya, S., T. Shimada, S. Fujita and N. S. Young (1989). "A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(19): 7601-5.

Karetnyi, Y. V., P. R. Beck, R. S. Markin, A. N. Langnas and S. J. Naides (1999). "Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure." *Arch Virol* 144(9): 1713-24.

Kaufmann, A. M., J. Nieland, M. Schinz, M. Nonn, J. Gabelsberger, H. Meissner, R. T. Muller, I. Jochmus, L. Gissmann, A. Schneider and M. Durst (2001). "HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination." *Int J Cancer* 92(2): 285-93.

Kaufmann, B., A. A. Simpson and M. G. Rossmann (2004). "The structure of human parvovirus B19." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(32): 11628-33.

Kawase, M., M. Momoeda, N. S. Young and S. Kajigaya (1995). "Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface." *Virology* 211(2): 359-66.

Kelly, H. A., D. Siebert, R. Hammond, J. Leydon, P. Kiely and W. Maskill (2000). "The age-specific prevalence of human parvovirus immunity in Victoria, Australia compared with other parts of the world." *Epidemiol Infect* 124(3): 449-57.

Kerr, S., G. O'Keeffe, C. Kilty and S. Doyle (1999). "Undenatured parvovirus B19 antigens are essential for the accurate detection of parvovirus B19 IgG." *J Med Virol* 57(2): 179-85.

Koch, W. C. and S. P. Adler (1989). "Human parvovirus B19 infections in women of childbearing age and within families." *Pediatr Infect Dis J* 8(2): 83-7.

Koch, W. C. and S. P. Adler (1990). "Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* 28(1): 65-9.

Kock, W. C. (1995). "A synthetic parvovirus B19 capsid protein can replace viral antigen in antibody-capture enzyme immunoassays." *J Virol Methods* 55(1): 67-82.

Koduri, P. R., R. Kumapley, J. Valladares and C. Teter (1999). "Chronic pure red cell aplasia caused by parvovirus B19 in AIDS: use of intravenous immunoglobulin--a report of eight patients." *Am J Hematol* 61(1): 16-20.

Komischke, K., K. Searle and G. Enders (1997). "Maternal serum alpha-fetoprotein and human chorionic gonadotropin in pregnant women with acute parvovirus B19 infection with and without fetal complications." *Prenat Diagn* 17(11): 1039-46.

- Kuhl, U., M. Pauschinger, T. Bock, K. Klingel, C. P. Schwimmbeck, B. Seeberg, L. Krautwurm, W. Poller, H. P. Schultheiss and R. Kandolf (2003). "Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction." *Circulation* 108(8): 945-50.
- Kuo, S. H., L. I. Lin, C. J. Chang, Y. R. Liu, K. S. Lin and A. L. Cheng (2002). "Increased risk of parvovirus B19 infection in young adult cancer patients receiving multiple courses of chemotherapy." *J Clin Microbiol* 40(11): 3909-12.
- Kurtzman, G. J., B. Cohen, P. Meyers, A. Amunullah and N. S. Young (1988). "Persistent B19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia." *Lancet* 2(8621): 1159-62.
- Kurtzman, G. J., B. J. Cohen, A. M. Field, R. Oseas, R. M. Blaese and N. S. Young (1989). "Immune response to B19 parvovirus and an antibody defect in persistent viral infection." *J Clin Invest* 84(4): 1114-23.
- Kurtzman, G. J., K. Ozawa, B. Cohen, G. Hanson, R. Oseas and N. S. Young (1987). "Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection." *N Engl J Med* 317(5): 287-94.
- Langnas, A. N., R. S. Markin, M. S. Cattral and S. J. Naides (1995). "Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia." *Hepatology* 22(6): 1661-5.
- Laub, R. and P. Strengers (2002). "Parvoviruses and blood products." *Pathol Biol (Paris)* 50(5): 339-48.
- Lefrere, J. J., A. M. Courouce, Y. Bertrand, R. Girot and J. P. Soulier (1986). "Human parvovirus and aplastic crisis in chronic hemolytic anemias: a study of 24 observations." *Am J Hematol* 23(3): 271-5.
- Lefrere, J. J., M. Mariotti and M. Thauvin (1994). "B19 parvovirus DNA in solvent/detergent-treated anti-haemophilia concentrates." *Lancet* 343(8891): 211-2.
- Lehmann, H. W., P. von Landenberg and S. Modrow (2003). "Parvovirus B19 infection and autoimmune disease." *Autoimmun Rev* 2(4): 218-23.
- Levy, R., A. Weissman, G. Blomberg and Z. J. Hagay (1997). "Infection by parvovirus B 19 during pregnancy: a review." *Obstet Gynecol Surv* 52(4): 254-9.
- Liu, H., Y. L. Ding, W. Han, M. Y. Liu, R. Y. Tian, S. L. Yang and Y. Gong (2004). "Recombinant scFv antibodies against E protein and N protein of severe acute respiratory syndrome virus." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36(8): 541-7.
- Liu, J. M., S. W. Green, T. Shimada and N. S. Young (1992). "A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus." *J Virol* 66(8): 4686-92.



Lombardo, E., J. C. Ramirez, M. Agbandje-McKenna and J. M. Almendral (2000). "A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly." *J Virol* 74(8): 3804-14.

Lombardo, E., J. C. Ramirez, J. Garcia and J. M. Almendral (2002). "Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection." *J Virol* 76(14): 7049-59.

Luckow, V. A. and M. D. Summers (1988). "Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors." *Virology* 167(1): 56-71.

Lukashov, V. V. and J. Goudsmit (2001). "Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses." *J Virol* 75(6): 2729-40.

Luo, W. and C. R. Astell (1993). "A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19." *Virology* 195(2): 448-55.

Mabin, D. C. and V. Chowdhury (1990). "Aplastic crisis caused by human parvovirus in two patients with hereditary stomatocytosis." *Br J Haematol* 76(1): 153-4.

Manaresi, E., G. Gallinella, M. Zerbini, S. Venturoli, G. Gentilomi and M. Musiani (1999). "IgG immune response to B19 parvovirus VP1 and VP2 linear epitopes by immunoblot assay." *J Med Virol* 57(2): 174-8.

Markenson, G. R. and M. K. Yancey (1998). "Parvovirus B19 infections in pregnancy." *Semin Perinatol* 22(4): 309-17.

Martinez, C., K. Dalsgaard, J. A. Lopez de Turiso, E. Cortes, C. Vela and J. I. Casal (1992). "Production of porcine parvovirus empty capsids with high immunogenic activity." *Vaccine* 10(10): 684-90.

McOmish, F., P. L. Yap, A. Jordan, H. Hart, B. J. Cohen and P. Simmonds (1993). "Detection of parvovirus B19 in donated blood: a model system for screening by polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol* 31(2): 323-8.

Miki, N. P. and J. K. Chantler (1992). "Non-permissiveness of synovial membrane cells to human parvovirus B19 in vitro." *J Gen Virol* 73 ( Pt 6): 1559-62.

Miller, E., C. K. Fairley, B. J. Cohen and C. Seng (1998). "Immediate and long term outcome of human parvovirus B19 infection in pregnancy." *Br J Obstet Gynaecol* 105(2): 174-8.

Miller, L. K. (1988). "Baculoviruses for foreign gene expression in insect cells." *Biotechnology* 10: 457-65.

Mitchell, L. A., R. Leong and K. A. Rosenke (2001). "Lymphocyte recognition of human parvovirus B19 non-structural (NS1) protein: associations with occurrence of acute and chronic arthropathy?" *J Med Microbiol* 50(7): 627-35.

Miyamura, K., S. Kajigaya, M. Momoeda, S. J. Smith-Gill and N. S. Young (1994). "Parvovirus particles as platforms for protein presentation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(18): 8507-11.

Modrow, S. and S. Dorsch (2002). "Antibody responses in parvovirus B19 infected patients." *Pathol Biol (Paris)* 50(5): 326-31.

Moffatt, S., N. Tanaka, K. Tada, M. Nose, M. Nakamura, O. Muraoka, T. Hirano and K. Sugamura (1996). "A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression." *J Virol* 70(12): 8485-91.

Moffatt, S., N. Yaegashi, K. Tada, N. Tanaka and K. Sugamura (1998). "Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells." *J Virol* 72(4): 3018-28.

Momoeda, M., M. Kawase, S. M. Jane, K. Miyamura, N. S. Young and S. Kajigaya (1994). "The transcriptional regulator YY1 binds to the 5'-terminal region of B19 parvovirus and regulates P6 promoter activity." *J Virol* 68(11): 7159-68.

Momoeda, M., S. Wong, M. Kawase, N. S. Young and S. Kajigaya (1994). "A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity." *J Virol* 68(12): 8443-6.

Monedero, V., J. Rodriguez-Diaz, R. Viana, J. Buesa and G. Perez-Martinez (2004). "Selection of single-chain antibodies against the VP8\* subunit of rotavirus VP4 outer capsid protein and their expression in *Lactobacillus casei*." *Appl Environ Microbiol* 70(11): 6936-9.

Morey, A. L., J. W. Keeling, H. J. Porter and K. A. Fleming (1992). "Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus." *Br J Obstet Gynaecol* 99(7): 566-74.

Morinet, F., C. Pallier, N. Foulon-Sol and S. Pillet (2000). "Molecular biology of erythroviruses." *Contrib Microbiol* 4: 123-32.

Mortimer, P. P., R. K. Humphries, J. G. Moore, R. H. Purcell and N. S. Young (1983). "A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro." *Nature* 302(5907): 426-9.

Munro, K., M. C. Croxson, S. Thomas and N. J. Wilson (2003). "Three cases of myocarditis in childhood associated with human parvovirus (B19 virus)." *Pediatr Cardiol* 24(5): 473-5.

- Musiani, M., M. Zerbini, D. Gibellini, G. Gentilomi, S. Venturoli, G. Gallinella, E. Ferri and S. Girotti (1991). "Chemiluminescence dot blot hybridization assay for detection of B19 parvovirus DNA in human sera." *J Clin Microbiol* 29(9): 2047-50.
- Naides, S. J., W. Piette, L. A. Veach and Z. Argenyi (1988). "Human parvovirus B19-induced vesiculopustular skin eruption." *Am J Med* 84(5): 968-72.
- Nguyen, Q. T., C. Sifer, V. Schneider, F. Bernaudin, V. Auguste and A. Garbarg-Chenon (1998). "Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia." *Lancet* 352(9139): 1524.
- Nguyen, Q. T., S. Wong, E. D. Heegaard and K. E. Brown (2002). "Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6." *Virology* 301(2): 374-80.
- Nibu, K., I. Matsumoto, F. Yanai and T. Nunoue (1989). "[Aplastic crisis due to human parvovirus B19 infection in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency]." *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi* 52(7): 1117-21.
- Nigro, G., M. Zerbini, A. Krzysztofiak, G. Gentilomi, M. A. Porcaro, T. Mango and M. Musiani (1994). "Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease." *Lancet* 343(8908): 1260-1.
- Omar, A. and C. Kempf (2002). "Removal of neutralized model parvoviruses and enteroviruses in human IgG solutions by nanofiltration." *Transfusion* 42(8): 1005-10.
- Onitilo, A. A. and G. R. Shaw (2005). "Parvovirus B19 infection in an isolated pancreas transplant recipient." *Transplant Proc* 37(10): 4433-5.
- Ozawa, K., J. Ayub, Y. S. Hao, G. Kurtzman, T. Shimada and N. Young (1987). "Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus." *J Virol* 61(8): 2395-406.
- Ozawa, K., J. Ayub, S. Kajigaya, T. Shimada and N. Young (1988). "The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells." *J Virol* 62(8): 2884-9.
- Ozawa, K. and N. Young (1987). "Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures." *J Virol* 61(8): 2627-30.
- Padron, E., V. Bowman, N. Kaludov, L. Govindasamy, H. Levy, P. Nick, R. McKenna, N. Muzyczka, J. A. Chiorini, T. S. Baker and M. Agbandje-McKenna (2005). "Structure of adeno-associated virus type 4." *J Virol* 79(8): 5047-58.
- Paintsil, J., M. Muller, M. Picken, L. Gissmann and J. Zhou (1996). "Carboxyl terminus of bovine papillomavirus type-1 L1 protein is not required for capsid formation." *Virology* 223(1): 238-44.

Pattison, J. R., S. E. Jones, J. Hodgson, L. R. Davis, J. M. White, C. E. Stroud and L. Murtaza (1981). "Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia." *Lancet* 1(8221): 664-5.

Pillet, S., Z. Annan, S. Fichelson and F. Morinet (2003). "Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2)." *Virology* 306(1): 25-32.

Pillet, S. and F. Morinet (2002). "Parvovirus B19 and erythroid cells." *Pathol Biol (Paris)* 50(5): 349-56.

Plentz, A., J. Hahn, E. Holler, W. Jilg and S. Modrow (2004). "Long-term parvovirus B19 viraemia associated with pure red cell aplasia after allogeneic bone marrow transplantation." *J Clin Virol* 31(1): 16-9.

Plummer, F. A., G. W. Hammond, K. Forward, L. Sekla, L. M. Thompson, S. E. Jones, I. M. Kidd and M. J. Anderson (1985). "An erythema infectiosum-like illness caused by human parvovirus infection." *N Engl J Med* 313(2): 74-9.

Prato, C., T. Paper and F. Morinet (1991). "Use of M13 single-stranded DNA digoxigenin labelled probe for detection of human parvovirus B19 viraemia." *J Virol Methods* 34(3): 227-31.

Qian, X. H., G. C. Zhang, X. Y. Jiao, P. Zhang, X. Sun, Y. H. Cao, D. L. Xu, L. L. Fei and W. J. Huang (2003). "[Genetic diversity of human Parvovirus B19 VP1 unique region]." *Zhonghua Er Ke Za Zhi* 41(2): 128-30.

Raab, U., B. Bauer, A. Gigler, K. Beckenlehner, H. Wolf and S. Modrow (2001). "Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19." *J Gen Virol* 82(Pt 6): 1473-80.

Raab, U., K. Beckenlehner, T. Lowin, H. H. Niller, S. Doyle and S. Modrow (2002). "NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3." *Virology* 293(1): 86-93.

Rakonjac, J., G. Jovanovic and P. Model (1997). "Filamentous phage infection-mediated gene expression: construction and propagation of the gIII deletion mutant helper phage R408d3." *Gene* 198(1-2): 99-103.

Ray, K., M. J. Embleton, B. L. Jaikhan, M. K. Bhan and R. Kumar (2001). "Selection of single chain variable fragments (scFv) against the glycoprotein antigen of the rabies virus from a human synthetic scFv phage display library and their fusion with the Fc region of human IgG1." *Clin Exp Immunol* 125(1): 94-101.

Rayment, F. B., E. Crosdale, D. J. Morris, J. R. Pattison, P. Talbot and J. J. Clare (1990). "The production of human parvovirus capsid proteins in *Escherichia coli* and their potential as diagnostic antigens." *J Gen Virol* 71 ( Pt 11): 2665-72.

Reguera, J., A. Carreira, L. Riolobos, J. M. Almendral and M. G. Mateu (2004). "Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2724-9.

Reguera, J., A. Carreira, L. Riolobos, J. M. Almendral and M. G. Mateu (2004). "Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2724-9.

Reid, D. M., T. M. Reid, T. Brown, J. A. Rennie and C. J. Eastmond (1985). "Human parvovirus-associated arthritis: a clinical and laboratory description." *Lancet* 1(8426): 422-5.

Reilly, R. M., P. K. Maiti, R. Kiarash, A. K. Prashar, D. G. Fast, J. Entwistle, Dan, S. A. Narang, S. Foote and H. A. Kaplan (2001). "Rapid imaging of human melanoma xenografts using an scFv fragment of the human monoclonal antibody H11 labelled with <sup>111</sup>In." *Nucl Med Commun* 22(5): 587-95.

Rerolle, J. P., E. Morelon, I. Helal, M. N. Peraldi, M. F. Mamzer-Bruneel and H. Kreis (2004). "Parvovirus B19-related anaemia after renal transplantation." *Scand J Infect Dis* 36(6-7): 513-6.

Ridgway, J. B., E. Ng, J. A. Kern, J. Lee, J. Brush, A. Goddard and P. Carter (1999). "Identification of a human anti-CD55 single-chain Fv by subtractive panning of a phage library using tumor and nontumor cell lines." *Cancer Res* 59(11): 2718-23.

Rodis, J. F., D. L. Quinn, G. W. Gary, Jr., L. J. Anderson, S. Rosengren, M. L. Cartter, W. A. Campbell and A. M. Vintzileos (1990). "Management and outcomes of pregnancies complicated by human B19 parvovirus infection: a prospective study." *Am J Obstet Gynecol* 163(4 Pt 1): 1168-71.

Rodis, J. F., C. Rodner, A. A. Hansen, A. F. Borgida, I. Deoliveira and S. Shulman Rosengren (1998). "Long-term outcome of children following maternal human parvovirus B19 infection." *Obstet Gynecol* 91(1): 125-8.

Rodriguez-Diaz, J., V. Monedero, G. Perez-Martinez and J. Buesa (2004). "Single-chain variable fragment (scFv) antibodies against rotavirus NSP4 enterotoxin generated by phage display." *J Virol Methods* 121(2): 231-8.

Rose, R. C., W. Bonnez, R. C. Reichman and R. L. Garcea (1993). "Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: in vivo and in vitro assembly of viruslike particles." *J Virol* 67(4): 1936-44.

- Rosenfeld, S. J., K. Yoshimoto, S. Kajigaya, S. Anderson, N. S. Young, A. Field, P. Warrenner, G. Bansal and M. S. Collett (1992). "Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface." *J Clin Invest* 89(6): 2023-9.
- Rosenfeld, S. J., N. S. Young, D. Alling, J. Ayub and C. Saxinger (1994). "Subunit interaction in B19 parvovirus empty capsids." *Arch Virol* 136(1-2): 9-18.
- Rouger, P., P. Gane and C. Salmon (1987). "Tissue distribution of H, Lewis and P antigens as shown by a panel of 18 monoclonal antibodies." *Rev Fr Transfus Immunohematol* 30(5): 699-708.
- Ruffing, M., H. Zentgraf and J. A. Kleinschmidt (1992). "Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells." *J Virol* 66(12): 6922-30.
- Saikawa, T., S. Anderson, M. Momoeda, S. Kajigaya and N. S. Young (1993). "Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1-VP2 junction regions." *J Virol* 67(6): 3004-9.
- Saldarelli, P., H. Keller, M. Dell'Orco, A. Schots, V. Elicio and A. Minafra (2005). "Isolation of recombinant antibodies (scFvs) to grapevine virus B." *J Virol Methods* 124(1-2): 191-5.
- Saliki, J. T., B. Mizak, H. P. Flore, R. R. Gettig, J. P. Burand, L. E. Carmichael, H. A. Wood and C. R. Parrish (1992). "Canine parvovirus empty capsids produced by expression in a baculovirus vector: use in analysis of viral properties and immunization of dogs." *J Gen Virol* 73 ( Pt 2): 369-74.
- Salimans, M. M., M. J. van Bussel, C. S. Brown and W. J. Spaan (1992). "Recombinant parvovirus B19 capsids as a new substrate for detection of B19-specific IgG and IgM antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay." *J Virol Methods* 39(3): 247-58.
- Salimans, M. M., F. M. van de Rijke, A. K. Raap and A. M. van Elsacker-Niele (1989). "Detection of parvovirus B19 DNA in fetal tissues by in situ hybridisation and polymerase chain reaction." *J Clin Pathol* 42(5): 525-30.
- Santagostino, E., P. M. Mannucci, A. Gringeri, A. Azzi and M. Morfini (1994). "Eliminating parvovirus B19 from blood products." *Lancet* 343(8900): 798.
- Sato, H., J. Hirata, N. Kuroda, H. Shiraki, Y. Maeda and K. Okochi (1991). "Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies." *J Virol* 65(10): 5485-90.
- Schild, R. L., R. Bald, H. Plath, A. M. Eis-Hubinger, G. Enders and M. Hansmann (1999). "Intrauterine management of fetal parvovirus B19 infection." *Ultrasound Obstet Gynecol* 13(3): 161-6.

- Schwarz, T. F., L. G. Gurtler, G. Zoulek, F. Deinhardt and M. Roggendorf (1989). "Seroprevalence of human parvovirus B19 infection in Sao Tome and Principe, Malawi and Mascarene Islands." *Zentralbl Bakteriol* 271(2): 231-6.
- Schwarz, T. F., A. Nerlich and P. Hillemanns (1993). "Detection of parvovirus B19 in fetal autopsies." *Arch Gynecol Obstet* 253(4): 207-13.
- Schwarz, T. F., M. Roggendorf, B. Hottentrager, S. Modrow, F. Deinhardt and J. Middeldorp (1990). "Immunoglobulins in the prophylaxis of parvovirus B19 infection." *J Infect Dis* 162(5): 1214.
- Schwarz, T. F., S. Serke, B. Hottentrager, A. von Brunn, H. Baurmann, A. Kirsch, W. Stolz, D. Huhn, F. Deinhardt and M. Roggendorf (1992). "Replication of parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood." *J Virol* 66(2): 1273-6.
- Scott, J. K. and G. P. Smith (1990). "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science* 249(4967): 386-90.
- Setubal, S., M. C. Jorge-Pereira, A. L. de Sant'Anna, S. A. de Oliveira, A. R. Bazin and J. P. do Nascimento (2003). "Clinical presentation of parvovirus B19 infection in HIV-infected patients with and without AIDS." *Rev Soc Bras Med Trop* 36(2): 299-302.
- Sevall, J. S. (1990). "Detection of parvovirus B19 by dot-blot and polymerase chain reaction." *Mol Cell Probes* 4(3): 237-46.
- Shade, R. O., M. C. Blundell, S. F. Cotmore, P. Tattersall and C. R. Astell (1986). "Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis." *J Virol* 58(3): 921-36.
- Shin, Y. C. and W. R. Folk (2003). "Formation of polyomavirus-like particles with different VP1 molecules that bind the urokinase plasminogen activator receptor." *J Virol* 77(21): 11491-8.
- Sidhu, S. S. (2001). "Phage display: increasing the rewards from genomic information." *Drug Discov Today* 6(18): 936.
- Siegl, G., R. C. Bates, K. I. Berns, B. J. Carter, D. C. Kelly, E. Kurstak and P. Tattersall (1985). "Characteristics and taxonomy of Parvoviridae." *Intervirology* 23(2): 61-73.
- Simpson, A. A., P. R. Chipman, T. S. Baker, P. Tijssen and M. G. Rossmann (1998). "The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution." *Structure* 6(11): 1355-67.
- Skaff, P. T. and D. M. Labiner (2001). "Status epilepticus due to human parvovirus B19 encephalitis in an immunocompetent adult." *Neurology* 57(7): 1336-7.

Skjoldebrand-Sparre, L., T. Tolfvenstam, N. Papadogiannakis, B. Wahren, K. Broliden and M. Nyman (2000). "Parvovirus B19 infection: association with third-trimester intrauterine fetal death." *Bjog* 107(4): 476-80.

Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* 228(4705): 1315-7.

Soderlund-Venermo, M., K. Hokynar, J. Nieminen, H. Rautakorpi and K. Hedman (2002). "Persistence of human parvovirus B19 in human tissues." *Pathol Biol (Paris)* 50(5): 307-16.

Sokal, E. M., M. Melchior, C. Cornu, A. T. Vandebroucke, J. P. Buts, B. J. Cohen and G. Burtonboy (1998). "Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children." *Lancet* 352(9142): 1739-41.

Sol, N., J. Le Junter, I. Vassias, J. M. Freyssinier, A. Thomas, A. F. Prigent, B. B. Rudkin, S. Fichelson and F. Morinet (1999). "Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19." *J Virol* 73(10): 8762-70.

Souriau, C. and P. J. Hudson (2003). "Recombinant antibodies for cancer diagnosis and therapy." *Expert Opin Biol Ther* 3(2): 305-18.

Souriau, C., J. Rothacker, H. R. Hoogenboom and E. Nice (2004). "Human antibody fragments specific for the epidermal growth factor receptor selected from large non-immunised phage display libraries." *Growth Factors* 22(3): 185-94.

Srivastava, A., E. Bruno, R. Briddell, R. Cooper, C. Srivastava, K. van Besien and R. Hoffman (1990). "Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro." *Blood* 76(10): 1997-2004.

Srivastava, A. and L. Lu (1988). "Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow." *J Virol* 62(8): 3059-63.

Srivastava, C. H., S. Zhou, N. C. Munshi and A. Srivastava (1992). "Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells." *Virology* 189(2): 456-61.

St Amand, J. and C. R. Astell (1993). "Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19." *Virology* 192(1): 121-31.

Sugawara, H., R. Motokawa, H. Abe, M. Yamaguchi, Y. Yamada-Ohnishi, J. Hirayama, H. Sakata, S. Sato, N. Kamo, K. Ikebuchi and H. Ikeda (2001). "Inactivation of parvovirus B19 in coagulation factor concentrates by UVC radiation: assessment by an in



vitro infectivity assay using CFU-E derived from peripheral blood CD34+ cells." *Transfusion* 41(4): 456-61.

Takahashi, T., K. Ozawa, K. Takahashi, S. Asano and F. Takaku (1990). "Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation." *Blood* 75(3): 603-10.

Taylor, D. J. and J. E. Johnson (2005). "Folding and particle assembly are disrupted by single-point mutations near the autocatalytic cleavage site of *Nudaurelia capensis* omega virus capsid protein." *Protein Sci* 14(2): 401-8.

Tolfvenstam, T., A. Lundqvist, M. Levi, B. Wahren and K. Broliden (2000). "Mapping of B-cell epitopes on human parvovirus B19 non-structural and structural proteins." *Vaccine* 19(7-8): 758-63.

Tolfvenstam, T., A. Oxenius, D. A. Price, B. L. Shacklett, H. M. Spiegel, K. Hedman, O. Norbeck, M. Levi, K. Olsen, M. Kantzanou, D. F. Nixon, K. Broliden and P. Klenerman (2001). "Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19." *J Virol* 75(1): 540-3.

Touze, A., D. Mahe, S. El Mehdaoui, C. Dupuy, A. L. Combata-Rojas, L. Bousarghin, P. Y. Sizaret and P. Coursaget (2000). "The nine C-terminal amino acids of the major capsid protein of the human papillomavirus type 16 are essential for DNA binding and gene transfer capacity." *FEMS Microbiol Lett* 189(1): 121-7.

Tsujimura, M., K. Matsushita, H. Shiraki, H. Sato, K. Okochi and Y. Maeda (1995). "Human parvovirus B19 infection in blood donors." *Vox Sang* 69(3): 206-12.

Umene, K. and T. Nunoue (1991). "Genetic diversity of human parvovirus B19 determined using a set of restriction endonucleases recognizing four or five base pairs and partial nucleotide sequencing: use of sequence variability in virus classification." *J Gen Virol* 72 ( Pt 8): 1997-2001.

Umene, K. and T. Nunoue (1993). "Partial nucleotide sequencing and characterization of human parvovirus B19 genome DNAs from damaged human fetuses and from patients with leukemia." *J Med Virol* 39(4): 333-9.

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

Valeur-Jensen, A. K., C. B. Pedersen, T. Westergaard, I. P. Jensen, M. Lebech, P. K. Andersen, P. Aaby, B. N. Pedersen and M. Melbye (1999). "Risk factors for parvovirus B19 infection in pregnancy." *Jama* 281(12): 1099-105.

- van Elsacker-Neile, A. M., F. P. Kroon, M. E. van der Ende, M. M. Salimans, W. J. Spaan and A. C. Kroes (1996). "Prevalence of parvovirus B19 infection in patients infected with human immunodeficiency virus." *Clin Infect Dis* 23(6): 1255-60.
- Vassias, I., U. Hazan, Y. Michel, C. Sawa, H. Handa, L. Gouya and F. Morinet (1998). "Regulation of human B19 parvovirus promoter expression by hGABP (E4TF1) transcription factor." *J Biol Chem* 273(14): 8287-93.
- Venturoli, S., G. Gallinella, E. Manaresi, G. Gentilomi, M. Musiani and M. Zerbini (1998). "IgG response to the immunoreactive region of parvovirus B19 nonstructural protein by immunoblot assay with a recombinant antigen." *J Infect Dis* 178(6): 1826-9.
- Vieira, J. and J. Messing (1987). "Production of single-stranded plasmid DNA." *Methods Enzymol* 153: 3-11.
- von Poblitzki, A., C. Gerdes, U. Reischl, H. Wolf and S. Modrow (1996). "Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19." *J Virol* 70(10): 7327-30.
- von Poblitzki, A., A. Hemauer, A. Gigler, E. Puchhammer-Stockl, F. X. Heinz, J. Pont, K. Laczika, H. Wolf and S. Modrow (1995). "Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis." *J Infect Dis* 172(5): 1356-9.
- Wakamatsu, C., F. Takakura, E. Kojima, Y. Kiriya, N. Goto, K. Matsumoto, M. Oyama, H. Sato, K. Okochi and Y. Maeda (1999). "Screening of blood donors for human parvovirus B19 and characterization of the results." *Vox Sang* 76(1): 14-21.
- Weigel-Kelley, K. A., M. C. Yoder and A. Srivastava (2001). "Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells." *J Virol* 75(9): 4110-6.
- Weigel-Kelley, K. A., M. C. Yoder and A. Srivastava (2003). "Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry." *Blood* 102(12): 3927-33.
- Weiland, H. T., M. M. Salimans, W. E. Fibbe, P. M. Kluin and B. J. Cohen (1989). "Prolonged parvovirus B19 infection with severe anaemia in a bone marrow transplant patient." *Br J Haematol* 71(2): 300.
- White, D. G., A. D. Woolf, P. P. Mortimer, B. J. Cohen, D. R. Blake and P. A. Bacon (1985). "Human parvovirus arthropathy." *Lancet* 1(8426): 419-21.
- Willats, W. G. (2002). "Phage display: practicalities and prospects." *Plant Mol Biol* 50(6): 837-54.

Williams, M. D., B. J. Cohen, A. C. Beddall, K. J. Pasi, P. P. Mortimer and F. G. Hill (1990). "Transmission of human parvovirus B19 by coagulation factor concentrates." *Vox Sang* 58(3): 177-81.

Williamson, P. and R. Matthews (1999). "Development of neutralising human recombinant antibodies to pertussis toxin." *FEMS Immunol Med Microbiol* 23(4): 313-9.

Winter, G., A. D. Griffiths, R. E. Hawkins and H. R. Hoogenboom (1994). "Making antibodies by phage display technology." *Annu Rev Immunol* 12: 433-55.

Wistuba, A., A. Kern, S. Weger, D. Grimm and J. A. Kleinschmidt (1997). "Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly." *J Virol* 71(2): 1341-52.

Wong, S., M. Momoeda, A. Field, S. Kajigaya and N. S. Young (1994). "Formation of empty B19 parvovirus capsids by the truncated minor capsid protein." *J Virol* 68(7): 4690-4.

Wong, S., N. S. Young and K. E. Brown (2003). "Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia." *J Infect Dis* 187(10): 1581-6.

Wolf, A. D., G. V. Campion, A. Chishick, S. Wise, B. J. Cohen, P. T. Klouda, O. Caul and P. A. Dieppe (1989). "Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults." *Arch Intern Med* 149(5): 1153-6.

Wright, C. (1998). "Detection of parvovirus B19 in macerated fetal tissue using in situ hybridization." *J Clin Pathol* 51(3): 262.

Wu, H. and M. G. Rossmann (1993). "The canine parvovirus empty capsid structure." *J Mol Biol* 233(2): 231-44.

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

Yaegashi, N., T. Niinuma, H. Chisaka, T. Watanabe, S. Uehara, K. Okamura, S. Moffatt, K. Sugamura and A. Yajima (1998). "The incidence of, and factors leading to, parvovirus B19-related hydrops fetalis following maternal infection; report of 10 cases and meta-analysis." *J Infect* 37(1): 28-35.

Yaegashi, N., H. Shiraishi, T. Takeshita, M. Nakamura, A. Yajima and K. Sugamura (1989). "Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver." *J Virol* 63(6): 2422-6.

Yokota, T., D. E. Milenic, M. Whitlow and J. Schlom (1992). "Rapid tumor penetration of a single-chain Fv and comparison with other immunoglobulin forms." *Cancer Res* 52(12): 3402-8.

Yokoyama, T., K. Murai, T. Murozuka, A. Wakisaka, M. Tanifuji, N. Fujii and T. Tomono (2004). "Removal of small non-enveloped viruses by nanofiltration." *Vox Sang* 86(4): 225-9.

Yoto, Y., T. Kudoh, K. Haseyama, N. Suzuki, S. Chiba and Y. Matsunaga (1994). "Human parvovirus B19 infection in Kawasaki disease." *Lancet* 344(8914): 58-9.

Young, N. S. (1996). "Parvovirus infection and its treatment." *Clin Exp Immunol* 104 Suppl 1: 26-30.

Young, N. S. and K. E. Brown (2004). "Parvovirus B19." *N Engl J Med* 350(6): 586-97.

Young, N. S., J. G. Moore and R. K. Humphries (1984). "The human parvovirus and in vitro hematopoietic colony formation." *Prog Clin Biol Res* 148: 129-39.

Yuan, W. and C. R. Parrish (2001). "Canine parvovirus capsid assembly and differences in mammalian and insect cells." *Virology* 279(2): 546-57.

Zaaijer, H. L., M. H. Koppelman and C. P. Farrington (2004). "Parvovirus B19 viraemia in Dutch blood donors." *Epidemiol Infect* 132(6): 1161-6.

Zadori, Z., J. Szelei, M. C. Lacoste, Y. Li, S. Garipey, P. Raymond, M. Allaire, I. R. Nabi and P. Tijssen (2001). "A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity." *Dev Cell* 1(2): 291-302.

Zakrzewska, K., A. Azzi, E. De Biasi, P. Radossi, R. De Santis, P. G. Davoli and G. Tagariello (2001). "Persistence of parvovirus B19 DNA in synovium of patients with haemophilic arthritis." *J Med Virol* 65(2): 402-7.

Zerbini, M., G. Gallinella, M. Cricca, F. Bonvicini and M. Musiani (2002). "Diagnostic procedures in B19 infection." *Pathol Biol (Paris)* 50(5): 332-8.

Ziegler, A., L. Torrance, S. M. Macintosh, G. H. Cowan and M. A. Mayo (1995). "Cucumber mosaic cucumovirus antibodies from a synthetic phage display library." *Virology* 214(1): 235-8.