

Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier

**Comparaison des déterminants génétiques de  
l'allotropisme *in vitro* des souches prototypes du  
Parvovirus Porcin**

Par

Sandra Fernandes

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor  
(Ph.D.) en Virologie et Immunologie

**Jury d'évaluation**

Présidente du jury et examineur interne	Angela Pearson, Ph.D., INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Benoit Barbeau, Ph.D., Université du Québec à Montréal
Examineur externe	Daniel Martineau, DMV., Ph.D., Université de Montréal
Directeur de recherche	Peter Tijssen, Ph.D., INRS-Institut Armand-Frappier

## Résumé

Le parvovirus porcin (PPV) est un virus ubiquitaire responsable de diverses pathologies de reproduction porcine regroupées sous l'acronyme SMEDI (mortinatalité, momification foetale, mort embryonnaire, et infertilité). Ce syndrome est une source importante de pertes économiques dans les élevages de porcs domestiques et peut faire des ravages dans les populations sauvages de sangliers. Malgré les nombreuses années écoulées depuis son identification, les mécanismes qui régissent l'allotropisme *in vivo* et *in vitro* de ce virus demeurent obscurs. Le cycle infectieux du PPV n'a été que très peu étudié au niveau cellulaire, la plupart des informations concernant sa réplication étant dérivées des travaux sur des virus qui lui sont apparentés.

Afin de mieux définir les mécanismes impliqués dans le contrôle de l'allotropisme du PPV *in vitro*, nous avons établi et caractérisé un système modèle basé sur la comparaison des deux souches prototypes de ce virus; soit l'une des souches vaccinales, NADL-2, et l'une des souches hautement virulentes chez l'animal, Kresse. Ces souches diffèrent au niveau de leur séquence par 13 nucléotides répartis sur l'ensemble du génome et par la présence d'une répétition de 127 nucléotides en aval des régions codantes. Le système modèle est composé d'une lignée de cellules porcines hautement susceptibles à l'infection par le PPV et de trois lignées de cellules bovines, établies à partir d'une culture primaire. Ces lignées démontrent divers phénotypes (permissif, semi-permissif ou restrictif) suite à l'infection par l'une ou l'autre des souches virales. Dans la lignée permissive porcine, l'efficacité de la réplication du génome diffère entre la souche vaccinale et la souche pathogène du PPV.

Dans un premier temps, nous avons comparé diverses étapes du cycle de réplication afin d'identifier celles qui étaient déterminantes pour l'allotropisme du PPV. Nous avons observé que la réplication virale était bloquée au niveau des étapes précoces lors des infections restrictives et que l'efficacité des étapes intermédiaires et tardives du cycle infectieux influençait le degré de permissivité et donc la productivité finale de l'infection.

Dans un deuxième temps, nous avons développé un système de clonage permettant la manipulation du génome du PPV afin de générer une banque de souches chimériques. La comparaison de l'infection par ces chimères a ensuite permis de cibler les

différences génétiques qui modulent l'efficacité de la réplication virale et qui sont impliquées dans le contrôle l'allotropisme *in vitro*. Ainsi, une interaction entre la séquence répétée et un fragment du gène des protéines structurales altère l'efficacité de la production virale. Enfin, un essai de compétition entre les différentes chimères a permis de cibler des éléments génétiques agissant à titre de déterminants ultimes de l'efficacité de la réplication du PPV.

Somme toute, cette caractérisation de divers déterminants de l'allotropisme et de l'efficacité de la réplication virale constitue une étude de base qui permettra ensuite l'étude plus détaillée des interactions du PPV avec la cellule hôte.

# Table des Matières

Résumé .....	ii
Table des matières .....	iv
Liste des figures.....	ix
Liste des tableaux .....	xii
Liste des abréviations .....	xiii
Préface .....	xviii
Remerciements.....	xx
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
1. Découverte et épidémiologie du Parvovirus Porcin.....	3
2. Classification et organisation de la famille des <i>Parvoviridae</i> .....	5
2.1 La sous-famille des <i>Parvovirinae</i> .....	5
2.1.1 Le genre <i>Bocavirus</i> .....	5
2.1.2 Le genre <i>Erythrovirus</i> .....	7
2.1.3 Le genre <i>Dependovirus</i> .....	8
2.1.4 Le genre <i>Parvovirus</i> .....	9
2.2 Les nouveaux Parvovirus non-classifiés.....	9
3. Les composantes physiques des parvovirus.....	10
3.1 Le génome.....	10
3.1.1 Organisation du génome : profil de transcription .....	13
3.1.2 Profil de transcription du PPV.....	14

3.1.2.1	Transcription à partir du promoteur précoce P4 .....	14
3.1.2.2	Profil de transcription à partir du promoteur tardif P40 .....	16
3.1.3	Régulation de l'épissage .....	16
3.2	Structure de la capside des parvovirus.....	18
4.	Rôles des protéines .....	23
4.1	La protéine NS1.....	23
4.2	La protéine NS2.....	29
4.3	La protéine VP1.....	34
4.4	La protéine VP2.....	36
4.5	La protéine SAT.....	39
5.	Le cycle de réplication viral .....	39
5.1	Les étapes précoces de l'infection.....	42
5.2	Les étapes intermédiaires de l'infection.....	45
5.2.1	La réplication du génome : Modèle de « l'épingle-roulante » .....	45
5.2.1.1	L'extrémité droite du génome: OriR et la résolution terminale .....	47
5.2.1.2	L'extrémité gauche du génome: OriL et la résolution asymétrique des jonctions dimériques .....	49
5.2.1.3	Résolution des jonctions dimériques chez le PPV.....	53
5.2.2	Contrôle de la transcription .....	53
5.2.3	Formation des corps de réplication nucléaires : APAR.....	55
5.3	Étapes tardives de l'infection .....	57
5.3.1	Libération du génome simple-brin et modèle d'encapsidation .....	57
5.3.2	Assemblage des virions et relâche des virions .....	58
5.3.3	Remodelage de la cellule lors des effets cytopathiques .....	60
6.	Tropisme .....	62

6.1	Effets de la transformation cellulaire.....	63
6.2	Tropisme des espèces du genre <i>Parvovirus</i> .....	64
6.2.1	Tropisme du FPV.....	64
6.2.2	Tropisme du MVM.....	65
6.2.3	Tropisme du PPV.....	67
7.	Hypothèse et objectifs du projet.....	70
<b>Premier article.....</b>		<b>71</b>
	Résumé du premier article.....	72
	Abstract.....	74
	Introduction.....	75
	Results.....	78
	Discussion.....	92
	Acknowledgements.....	94
	Materials and Methods.....	96
	References.....	101
<b>Deuxième article.....</b>		<b>109</b>
	Résumé du deuxième article.....	110
	Abstract.....	112
	Text.....	113
	Acknowledgements.....	115
	References.....	118
<b>Troisième article.....</b>		<b>119</b>
	Résumé du troisième article.....	120
	Abstract.....	122
	Text.....	123

Conclusion.....	131
References .....	132
<b>Résultats supplémentaires .....</b>	<b>135</b>
<b>Discussion.....</b>	<b>137</b>
1. Restriction totale : la lignée cellulaire bovine D10 .....	138
1.1 Livraison du génome au noyau.....	140
1.2 Réplication du génome .....	141
2. Restriction partielle : la lignée cellulaire G11 .....	142
2.1 Transport des protéines.....	142
2.2 Amplification du génome .....	143
3. Infection permissive : La lignée cellulaire bovines F4 .....	144
4. L'infection permissive : réplication virale dans les cellules PT .....	145
4.1 Influence des protéines structurales .....	145
4.2 Influence des protéines non-structurales .....	146
4.3 Rôles du génome .....	147
4.4 Rôles des séquences répétées .....	149
4.5 Rôles des contreparties cellulaires .....	149
5. L'étude de l'allotropisme.....	150
5.1 <i>In vitro</i> vs <i>in vivo</i> .....	150
5.2 Tropicisme tissulaire .....	150
6. L'évolution du PPV.....	152
7. Phylogénie et émergence .....	154
<b>Conclusion .....</b>	<b>155</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>157</b>
<b>Annexe I.....</b>	<b>209</b>

Résumé de l'Annexe I.....	210
Abstract .....	211
Introduction.....	211
Materials and Methods .....	212
Results.....	213
Discussion .....	219
Acknowledgments .....	220
References .....	220
<b>Annexe II .....</b>	<b>222</b>
Résumé de l'Annexe II.....	223
Abstract .....	224
Introduction.....	224
The Study .....	227
Conclusions .....	227
References .....	227
<b>Annexe III.....</b>	<b>228</b>
<b>Annexe IV .....</b>	<b>232</b>



# Liste des figures

## Introduction

Figure 1. Phylogénie des membres de la famille des <i>Parvoviridae</i> basée sur la comparaison de la séquence de la protéine NS1.....	6
Figure 2. Organisation du génome des Parvovirus.....	12
Figure 3. Organisation du génome et profil de transcription du PPV.....	15
Figure 4. Profil d'épissage du petit intron et de la traduction de la protéine SAT chez différents Parvovirus .....	17
Figure 5. Repliement des protéines structurales dans la capside .....	20
Figure 6. Morphologie des capsides des parvovirus.....	22
Figure 7. Domaines fonctionnels de la protéine NS1 du MVM. ....	24
Figure 8. Modèle proposé de l'interaction entre la NS1 et la CKII $\alpha$ et les PKC. ....	30
Figure 9. Alignement des séquences de la NS2 de plusieurs parvovirus.....	32
Figure 10. Comparaison du NLM des protéines VP2 entre le PPV et le MVM .....	38
Figure 11. Cycle de réplication du PPV. ....	41
Figure 12. Étapes précoces de l'infection par le PPV.....	43
Figure 13. Conversion du génome simple-brin en la matrice de transcription par le complexe de réplication de la polymérase $\delta$ .....	46
Figure 14. Réplication du génome des Parvovirus par le modèle de « l'épingle roulante ».....	48
Figure 15. Réplication de l'extrémité droite du génome.....	50
Figure 16. Résolution asymétrique de la jonction dimérique (OriL).....	52
Figure 17. Résolution de la jonction dimérique.....	54
Figure 18. Organisation des sites de liaison des facteurs de transcription au niveau de promoteur P4 chez le MVM.....	56
Figure 19. Encapsidation préférentielle du génome de polarité négative chez la plupart des membres du genre <i>Parvovirus</i> . ....	59
Figure 20. Rôles complémentaires des signaux de localisation nucléaires des protéines VP dans le transport des sous-unités trimériques et dans l'assemblage de la capside.....	61
Figure 21. Évolution et émergence des souches du FPV.....	66

Figure 22. Déterminant allotropique des souches Kresse et NADL-2 du PPV sur les cellules primaires TV .....	69
--	----

**Premier article**

Figure 1. Sensitivity of bovine (F4, G11, D10) and porcine (PT) cell lines to infection by PPV strains. ....	81
Figure 2. Synthesis of viral genome replication intermediates in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 or Kresse at an MOI of 5 FFU. ....	83
Figure 3. Viral DNA replication kinetics in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 (A) or Kresse (B) at an MOI of 5 FFU .....	85
Figure 4. Distribution of VP proteins in cytoplasmic and nuclear fractions from porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 or Kresse at an MOI of 5 FFU .....	87
Figure 5. Distribution of capsids and VP2 proteins in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 or Kresse at an MOI of 5 FFU .....	89
Figure 6. Kinetics of infectious virus released in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 (A) or Kresse (B) at an MOI of 5 FFU .....	91
Figure 7. Molecular modeling of residues on the capsid surface proposed to interact with critical residues (D378G and H383Q) from the allotropic determinant. ....	95

**Deuxième article**

Figure 1. Principles of seamless cloning and domain swapping.....	117
---	-----

**Troisième article**

Figure 1. Construction of chimeras from the NADL-2 and Kresse PPV strains .....	126
Figure 2. Replication of the chimeras and wild-type strains in single-round infections assays.....	128
Figure 3. Relative replication fitness of the chimeras .....	130

## Résultats supplémentaires

Figure S1. Réplication des chimères et des souches sauvages du PPV au cours d'un cycle d'infection dans les cellules bovines.....	136
--	-----

## Annexe I

Figure 1. Kinetics of PPV infection .....	214
Figure 2. PPV binding on the cell surface.....	215
Figure 3. Entry pathways.....	216
Figure 4. Cytoplasm trafficking toward the nucleus .....	217
Figure 5. Proteasome involvement.....	218

## Annexe II

Figure 1. Parallel PCR amplification of PARV4-like (A) and PPV (B) by using purified DNA from clotting FVIII preparations .....	224
Figure 2. Construction of phylogenic trees for newly identified porcine viruses and comparison with previously identified prototype parvovirus4 (PARV4)-like sequences.....	226

# Liste des tableaux

## Premier article

Table 1. CPE developed throughout infection by PPV NADL-2 or Kresse strains on porcine (PT) and bovine cell lines (F4, G11, D10) .....	80
--	----

## Deuxième article

Table 1. Useful “auto-excision” restriction enzymes for seamless cloning .....	116
--	-----

## Troisième article

Table 1. Sequence analysis of PPV pools in pancrelipase extracts produced in North America between 2005 and 2009 .....	125
--	-----

## Discussion

Tableau 1. Efficacité relative des étapes restrictives à l'infection par les souches de PPV .....	139
---	-----

## Annexe I

Table 1. Chemical inhibitors .....	214
------------------------------------	-----

## Annexe II

Table 1. Percentage diversity of genome sequences of PARV4-like viruses .....	225
---	-----

Table 2. Analysis of relationships among the protein sequences of PARV4-like viruses .....	225
--	-----

## Liste des abréviations

2Nt	Région N-terminale de la protéine VP2
3'-OH	Extrémité 3'-Hydroxyle de l'ADN
5'-P	Extrémité 5'-Phosphate de l'ADN
A9	Lignée cellulaire de fibroblastes murins A9
AAV	Parvovirus « Adeno-Associated Virus »
AAVr	AAV recombinant
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMDV	Virus de la maladie aléoutienne du vison « Aleutian Disease of Mink Virus »
AMP	Adénosine monophosphate
APARs	Corps de réplication nucléaire des parvovirus « Autonomous parvovirus associated replication bodies »
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
Arp2/3	Complexe des « Actin-Related Protein » de la polymérisation de l'actine
ATF	Protéine « Activation transcription factor 1 »
ATP	Adénosine triphosphate
B19	Parvovirus humain B19
BC	Groupes d'acides aminés basiques « Basic Cluster »
BPV-1	Parvovirus bovin type 1 « Bovine Parvovirus type 1 »
CCID50	Dose infectieuse en culture cellulaire « Cell Culture Infective Dose »
Cdk2	Protéine « Cyclin-dépendant kinase 2 »
CKII $\alpha$	Caséine Kinase II alpha

CnMV	Parvovirus « Canine Minute Virus »
CPN	Complexe du pore nucléaire
CPV	Parvovirus Canin
CRE	Élément de réponse à l'AMP cyclique
CREB	Protéine « cyclic AMP-Response Element Binding »
Crm1	Karyophérine « Chromosomal Region Maintenance 1 »
C-terminale	Extrémité carboxyle-terminale d'une protéine ou d'un polypeptide
Cyto	Cytoplasme
DNase	Désoxyribonucléase
DPV	Parvovirus du canard « Duck Parvovirus »
dRF	Forme dimérique répliquative du génome « dimeric replicative form »
En-PV	Parvovirus endogènes
FFU	Unités formatrice de foyer fluorescent « Fluorescent Foci forming Units »
FPV	Virus de la panleucopénie féline
GCE	Unités de copies de génome « Genome Copy Equivalents »
GDP	Guanosine diphosphate
GmDNP	Densovirus de <i>Galleria mellonella</i>
GPV	Parvovirus de l'oie « Goose Parvovirus »
GTP	Guanosine triphosphate
H1-PV ou H1	Parvovirus du hamster 1
HMG1/2	High mobility group protein 1/2
hnRNP	Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogènes
HSV	Virus de l'Herpes Simplex
ICTV	Comité international de la taxonomie des virus « International Committee on the Taxonomy of Viruses »
IES	Séquence stimulateur de l'excision des introns « intron splice enhancer »

ITR	Répétitions terminales inversées « Inverted terminal repeats »
kb	kilobase
kDa	kilo Dalton
KRV	Parvovirus du rat Kilham
LAMP2	Protéine « Lysosomal Associated Membrane Protein 2 »
Lu III	Parvovirus des rongeurs LuIII
MAPK	Protéine « Mitogen activated protein kinase »
MDCK	Lignée cellulaire Madin-Darby Canine Kidney
MEV	Virus de l'entérite du vison « Mink Enteritis Virus »
MOI	Multiplécité d'infection
MPV1	Parvovirus de la souris 1 « Mouse Parvovirus-1 »
mRF	Forme monomérique réplécative du génome « monomer replicative form »
MVM	Minute Virus of Mice
MVMi	Souche lymphotropique du parvovirus MVM
MVMp	Souche prototypique ou fibrotropique du parvovirus MVM
NES	Signal d'export nucléaire « Nuclear export signal »
NLM	Motif de localisation nucléaire « Nuclear localization motif »
NLS	Signal de localisation nucléaire « Nuclear localization signal »
nm	Nanomètre
NP-1	Nucléophosphoprotéine 1
NS	Protéine non-structurale
N-terminale	Extrémité amino-terminale d'une protéine ou d'un polypeptide
NTP	Nucléotide triphosphate
OriL	Origine de réplécation à l'extrémité gauche du génome des Parvovirus
OriR	Origine de réplécation à l'extrémité droite du génome des Parvovirus

Parv4	Parvovirus humain Parv4
PBMC	Cellules mononucléaire du sang périphérique « Peripheral Blood Mononuclear Cell »
PCNA	Protéine « Proliferating cell nuclear antigen »
PDK-1	Protéine « Phosphoinositide-dependant-kinase-1 »
PFT	Lignée cellulaire des trompes de Fallope porcine « Porcine Falloppian tube »
PFU	Unités formatrice de plages de lyse (Plaque Forming Units)
PHoV	Hokovirus Porcin
PIF	Parvovirus initiation factor (aussi « glucocorticoid modulating element)
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKC $\lambda$	Isoforme lambda de la PKC
PKC $\eta$	Isoforme éta de la PKC
PKR	Protéine kinase R
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PML	Corps nucléaires de « Progressive multifocal leukoencephalopathy »
PMWS	Syndrome du dépérissement post-sevrage « Postweaning multisystemic wasting syndrome »
Pol $\alpha$	Isoforme alpha de la Polymérase d'ADN cellulaire II
Pol $\delta$	Isoforme delta de la Polymérase d'ADN cellulaire II
PPV	Parvovirus porcin
PstDNV	Densovirus de la crevette <i>Penaeus stylirostris</i>
PT	Lignée cellulaire de testicules porcine « Porcine testis »
RFC	Protéine « Replicating factor C »
RPA	Protéine « Replication Protein A »



RPV	Parvovirus du raton-laveur « Raccoon Parvovirus »
RSMD	Écart quadratique moyen « root mean square deviation »
SAABs	Corps de réplication nucléaire des parvovirus associés à la protéine « Survival Motor Neuron » « Smn-Associated APAR bodies »
SAT	Protéine non-structural tardive « Small Alternatively Translated protein »
sPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> sécrétés
Smn	Protéine « Survival Motor Neuron »
ST	Lignée cellulaire de testicules porcines « Swine testis »
SV40	Virus Simien 40
<i>tar</i>	Séquence de liaison de la protéine NS1 en amont du promoteur tardif P40, nécessaire à la trans-activation « trans-activation response »
TBP	Protéine « TATA - Binding »
TCID50	Dose infectieuse en culture cellulaire « Tissue culture infective dose »
TFIIA	Facteur de transcription II A
TfR	Récepteur de la transferrine « Transferrin Receptor »
TV	Culture primaire de cellules de testicules bovines
VP	Protéine structurale « Virus protein »
VP1up	Région unique de la VP1
vPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> virale
WASP	Protéine « Wiscott-Aldrich Syndrome »

# Préface

Les travaux effectués dans le cadre de cette thèse sont présentés sous la forme de trois articles, qui forment la partie centrale de cet essai. En guise d'introduction, une revue de la littérature sur le Parvovirus Porcin et sur les virus qui lui sont apparentés propose d'exposer les connaissances actuelles sur le sujet. Enfin, l'implication des résultats et les perspectives de recherche sont discutées à la fin du manuscrit. Les deux annexes présentent des travaux indirectement reliés au thème de cette thèse, sous la forme de deux articles, auquel l'auteur de ce manuscrit a participé. La contribution de l'auteur aux articles présentés dans cette thèse est décrite ici-bas.

## **Premier article :**

Fernandes, S., Boisvert, M., Szelei, J. and Tijssen, P. Multiple steps of the Porcine Parvovirus infectious cycle are involved in tropism control in bovine cell lines.

Les expériences ont été conçues par S.F et P.T. et réalisées par majoritairement S.F.

M.B. a participé à la récolte des échantillons pour les cinétiques et a commenté le manuscrit. J.S. a effectué la sélection des lignées cellulaires bovines.

L'article a été rédigé par S.F. et P.T.

## **Deuxième article :**

Fernandes, S., and P. Tijssen. 2009. Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA. *Anal. Biochem*, 385 (1):171-3.

Les expériences ont été conçues par S.F. et P.T. et réalisées par S.F.

Le manuscrit a été rédigé par S.F. et P.T.

### Troisième article :

Fernandes, S., Boisvert, M. and Tijssen, P. (2011). Genetic elements in the VP region of Porcine Parvovirus are critical to replication efficiency in cell culture. *J.Virol.* 85, 3025-9.

Les expériences ont été conçues par S.F et P.T. et réalisées par majoritairement S.F.

M.B. a contribué à la récolte des échantillons pour les cinétiques, aux essais de qPCR et a commenté le manuscrit.

L'article a été rédigé par S.F. et P.T.

### Annexe I :

Boisvert M., Fernandes S. et Tijssen P. (2010). Multiple pathways involved in Porcine Parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *Journal of Virology*, 84 (15): 7782-92.

S.F. a établi le système de qPCR spécifique au PPV et pour *c-myc* porcin, a généré le clone infectieux de la souche NADL-2 et a commenté le manuscrit.

### Annexe II :

Szelei, J., Liu, K., Li Y., Fernandes, S. and Tijssen, P. (2010). Parvovirus 4-like Virus in Blood Products. *Emerging Infectious Diseases*. 16 (3): 561-4.

Les expériences ont été conçues par J.S., S.F. et P.T.

S.F. a criblé un tiers des échantillons, a amplifié les fragments du génome à partir des échantillons positifs pour le séquençage et a commenté le manuscrit.

# Remerciements

La poursuite d'études graduées n'est pas une étape de vie qui peut être faite sans la contribution de nombreuses personnes au fil des années. Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Peter Tijssen, qui m'a encouragé à poursuivre mes études au niveau doctoral et qui avait confiance, malgré les nombreuses embûches, que j'arriverais à mener ce projet à terme même lorsque j'avais du mal à y croire moi-même. Vos idées géniales et la liberté que vous m'avez laissé pour explorer diverses avenues pour ce projet m'ont permis d'apprendre énormément. Vous m'avez aussi donné la chance de participer à de nombreux congrès où j'ai pu prendre du recul par rapport à mon projet afin de revenir avec « la tête pleine d'idées ».

Je désire aussi remercier la Fondation Armand-Frappier pour le support financier qui m'a été accordé pour plus de la moitié de la durée de mes études.

Je remercie sincèrement les nombreux amis et collègues que j'ai eu l'honneur de côtoyer au cours des années. Je vais toujours me souvenir des « Post-It » du temps des Fêtes, des « Not-To-Do List » et des « Clonies », j'aurai toujours le sourire aux lèvres en pensant à « Don't cry for me Argentina » et aux chemises à « froufrous ». Et sachez que même si certains liens se sont estompés au fil du temps, je ne retiens que les bons moments passés en votre compagnie. Merci à Penny A. Rudd et Maria Lymberopoulos, vous m'avez souvent rassurée que je n'étais pas la seule qui craignait devenir dingue aux cours de ces cinq dernières années. Je désire remercier particulièrement Chahrazed Belabani, Philippe Constant et Mélanie Welman, trois personnes que j'admire énormément pour le dévouement, la persévérance et la ténacité dans leurs cheminements professionnels et personnels. J'ai l'honneur de vous compter comme amis.

En terminant, je tiens à remercier ma famille et Sylvie Gauthier, mon système de support inébranlable. Vous avez été là depuis toujours pour me tendre une oreille, une épaule et même un toit. Je n'ai pas les mots pour décrire avec justice comment vous comptez pour moi. Et enfin, je dédie cette thèse à ma grand-mère, Mme Lucille Lavigne Béliveau, qui nous a malheureusement quittés avant que j'entreprenne mes études de doctorat. Elle m'avait enseigné la valeur d'aller jusqu'au bout de soi-même, en n'oubliant jamais ceux et celles qui nous ont aidés en cours de route.

# Introduction

Le Parvovirus Porcin (PPV) est un virus distribué globalement. Sa présence au sein des populations porcines est répandue dans les élevages domestiques et dans les troupeaux sauvages de sangliers. Toutefois, la nature même de ce virus le rend plutôt sournois, puisqu'il ne cause aucune pathologie apparente chez l'animal adulte. Les jeunes porcelets et les animaux en cours de gestation sont par contre hautement susceptibles au PPV. Ceci entraîne donc des pertes économiques considérables pour les éleveurs malgré les pratiques de vaccination. Néanmoins, peu de recherches sont centrées sur l'étude de ce pathogène, dont la pathologie et le cycle de réplication demeurent largement inconnus. Les études *in vivo* sont limitées entre autres par le coût élevé de manutention des porcs en conditions « stériles » et les travaux *in vitro* demeurent restreints par le faible nombre de modèles de culture cellulaire permettant la réplication productive de ce virus. De surcroît, il est souvent pris pour acquis que les mécanismes de réplication du PPV se résument à ceux identifiés pour les virus qui lui sont apparentés tels le parvovirus murin Minute virus of Mice (MVM) et le parvovirus canin (CPV). Cependant, nos études récentes sur les étapes précoces de l'infection *in vitro* ont identifié une nouvelle voie par laquelle le PPV est internalisé par la cellule hôte et plusieurs différences dans le transport des virions vers le noyau par rapport aux autres parvovirus (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). La dissection des étapes du cycle infectieux du PPV constitue donc un axe de recherche important pour comprendre la pathologie et le tropisme de ce virus. D'ailleurs, lorsqu'on considère que plusieurs produits biologiques d'origine porcine sont utilisés pour le traitement de maladies chez l'humain, tels les préparations de pancrélipases ou de concentrés de facteur VIII, et que ceux-ci peuvent être contaminés par le PPV et d'autres virus apparentés (Szelei *et al.*, 2010), l'analyse des mécanismes qui influent sur le tropisme de ces virus devrait être un sujet préconisé.

La revue de littérature suivante propose d'exposer la plupart des connaissances actuelles sur le PPV et les Parvovirus, en débutant par l'épidémiologie du PPV et l'organisation de la famille des *Parvoviridae*. Puis, une description de la structure et de l'organisation du génome viral et de la capsidie permet de révéler l'organisation physique de ce virus. Le résumé des fonctions connues des protéines virales et de leurs interactions avec les protéines cellulaires est ensuite décrit puis intégré dans la description du cycle de réplication viral. Enfin, la revue de littérature se conclue par l'exposé des connaissances actuelles sur les mécanismes qui influencent le tropisme de divers Parvovirus et du PPV, ce qui permettra en dernier lieu d'énoncer la problématique et les objectifs de cette thèse.

# 1. Découverte et épidémiologie du Parvovirus Porcin

Le syndrome de reproduction porcine SMEDI a été caractérisé par Howard Dunne en 1965 (Dunne *et al.*, 1965). L'acronyme de la maladie correspond aux diverses pathologies observées fréquemment dans les élevages, soit la mortinatalité, la momification foetal, la mort embryonnaire et l'infertilité (SStillbirths, Mummification, Embryonic Ddeath, Infertility). Cette première étude avait toutefois identifié l'agent étiologique comme étant un picornavirus, bien que la caractérisation subséquente ait permis de le classer parmi les parvovirus (Cartwright, Lucas, et Huck, 1969; Cartwright, Lucas, et Huck, 1971; Johnson et Collings, 1969). Dans les années suivant son identification, il a été démontré que la prévalence d'animaux séropositifs au PPV était élevée dans l'ensemble des États-Unis (>40% de 420 échantillons de sérum porcine) (Mengeling, 1972). À l'heure actuelle, il est bien établi que ce virus est retrouvé globalement au sein des élevages porcins et des populations sauvages de sangliers (Roic *et al.*, 2005; Vicente *et al.*, 2002).

Le PPV est un virus très résistant qui persiste plusieurs mois en conditions environnementales et est considéré enzootique des élevages porcins (Mengeling et Paul, 1986). La transmission horizontale se fait surtout par voie orale-fécale, le virus étant retrouvé dans les sécrétions et les excréments lors d'infections aiguës chez le porc. L'infection par le PPV chez l'animal adulte séronégatif est généralement asymptomatique, bien qu'une virémie transitoire (2-4 jours) et une légère leucopénie peuvent souvent être observées dans la première semaine suivant l'infection (Johnson et Collings, 1971). Les anticorps hémagglutinants et neutralisants sont détectés dès 6-9 jours, les titres étant maximaux (1 :20 000) autour de 14-21 jours post-infection. La réplication du PPV a été observé *in vitro* dans les leucocytes et monocytes du sang périphérique porcine (PBMC) (Harding et Molitor, 1988; Paul, Mengeling, et Brown, 1979), tandis que le génome viral peut être détecté dans les ganglions lymphatiques et dans la rate *in vivo* (Choi et Chae, 2000).

L'infection de la cochette ou de la truie au cours du premier tiers de la gestation peut entraîner d'importants problèmes de reproduction suivant la propagation du virus à l'embryon ou au foetus. La transmission verticale du PPV dépend toutefois de la souche en cause et du moment de la gestation où l'infection a lieu. L'infection précoce, avant le 35<sup>e</sup> jour de gestation, entraîne la résorption de l'embryon (Mengeling, Paul, et Brown, 1980) tandis que l'infection foetal entre le 35<sup>e</sup> et le 70<sup>e</sup> jour de gestation engendre la mort embryonnaire. Si l'ossification du foetus a lieu avant la mort de l'embryon, la momification

foetale et/ou la mortinatalité peuvent être observées (Joo, Donaldson-Wood, et Johnson, 1976; Mengeling et Cutlip, 1975; Mengeling et al., 1975). L'immunocompétence foetale se développe autour du 70<sup>e</sup> jour de gestation, suite à laquelle les fœtus deviennent séropositifs et survivent généralement à l'infection (Mengeling et Paul, 1981).

Plusieurs souches et variants du PPV ont été caractérisés et classés selon leur capacité pathogène. Les souches non-pathogènes telles qu'utilisées pour la vaccination (ex. : NADL-2) ne causent qu'une faible virémie chez l'animal et ne traversent pas la barrière placentaire (Johnson et Collings, 1971; Mengeling et Cutlip, 1976; Mengeling, Pejsak, et Paul, 1984). Ces souches entraînent toutefois la mort foetale lorsqu'elles sont injectées *in utero* dans les liquides extra-foetaux (Cutlip et Mengeling, 1975b; Mengeling et Cutlip, 1975). Au contraire, les souches pathogènes, telles que NADL-8 et Kresse, traversent la barrière placentaire et entraînent diverses conséquences chez le fœtus, selon le moment de la gestation où l'infection a lieu (Choi *et al.*, 1987). La souche Kresse, isolée à partir de lésions cutanées, a été impliquée dans la mort foetale après le développement de l'immunocompétence (Choi *et al.*, 1987; Kresse *et al.*, 1985). La réplication du virus a été observée dans de nombreux tissus foetaux (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1993) et l'infection au niveau des cellules du système vasculaire cause l'hémorragie, l'œdème et l'accumulation de liquides sériques dans les cavités corporelles (Joo *et al.*, 1977). Bien que les mécanismes permettant au virus de traverser la barrière placentaire n'aient jamais été établis, il a été suggéré que les virions pourraient être transportés par les macrophages suite à la phagocytose. Certaines études ont noté l'œdème et la calcification de la membrane placentaire suggérant au contraire que le virus se réplique directement dans les tissus de la barrière placentaire (Joo *et al.*, 1977). Ainsi, les mécanismes régissant la transmission verticale du PPV demeurent incertains.

La vaccination des animaux est une méthode efficace pour contrôler la transmission du PPV, réduisant significativement l'ampleur des pertes économiques engendrées par l'infection des animaux en cours de gestation (Wrathall, 1988). Il a été démontré que la co-infection par le PPV et le circovirus porcin 2 entraîne l'exacerbation du syndrome du dépérissement post-sevrage (PMWS) (Choi et Chae, 2000; Krakowka et al., 2000), augmentant ainsi les coûts associés à l'infection par ces virus. Bien que les mécanismes du développement de cette maladie demeurent encore obscurs, il a été proposé que la potentialisation résulte de l'infection aiguë des cellules des lignées monocytaires (Allan *et al.*, 2004).



## 2. Classification et organisation de la famille des *Parvoviridae*

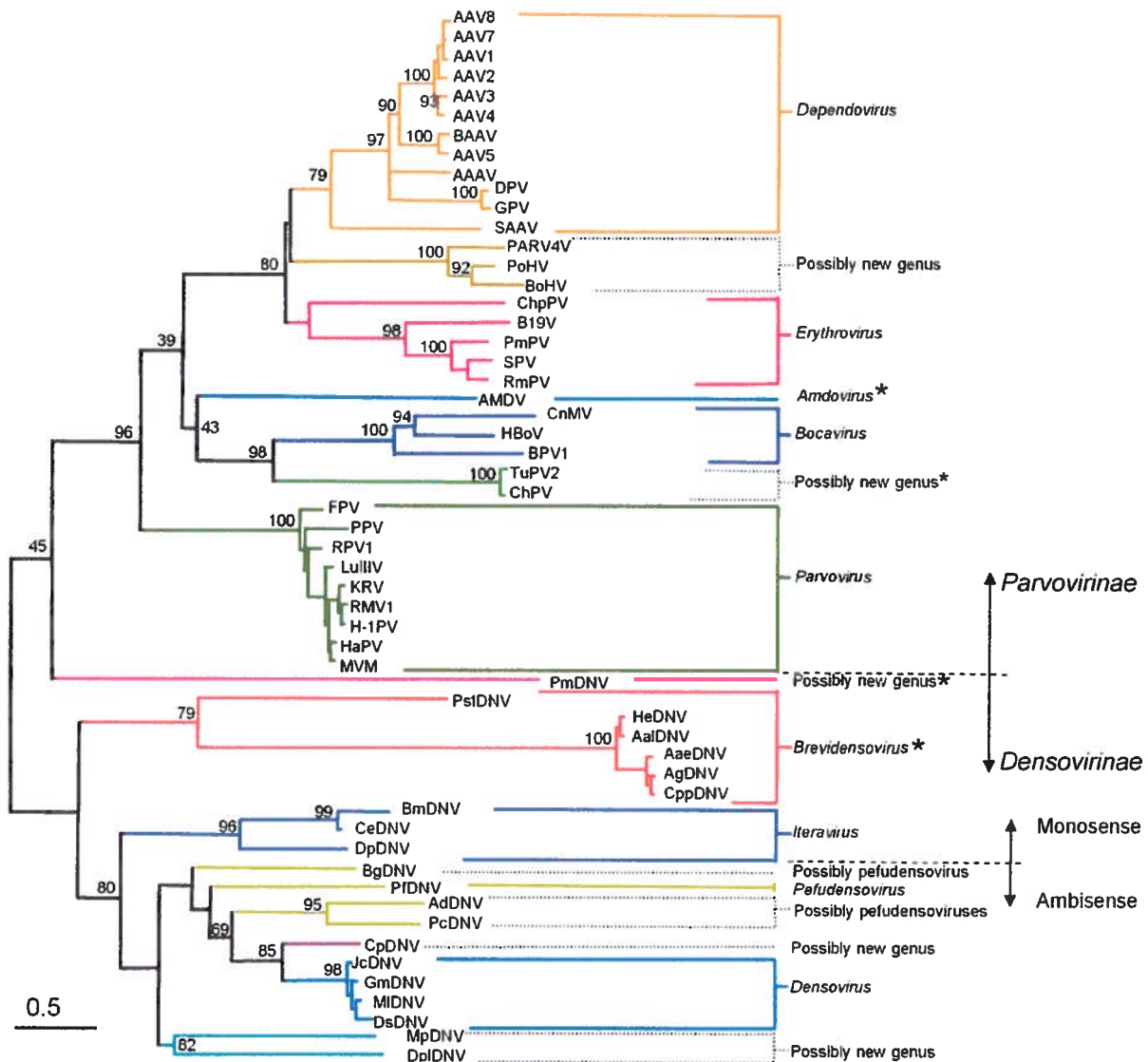
Le PPV s'inscrit dans la famille des *Parvoviridae*, soit un groupe de petits virus non-enveloppés, ayant une capsidie à symétrie icosaédrique. Le génome de ces derniers consiste en une molécule linéaire d'ADN monocaténaire variant entre 4 et 6 kb. Celle-ci est caractérisée par la présence de séquences terminales palindromiques qui permettent le repliement du génome et la formation de structures en épingle à cheveux (Tattersall, 2006). Cette famille de virus se divise en deux sous-familles, selon le type d'espèce hôte. Ainsi l'« International Committee on Taxonomy of Viruses » (ICTV) reconnaît la sous-famille des *Densovirinae*, qui infectent les invertébrés (arthropodes et insectes) et la sous-famille des *Parvovirinae* qui infectent les vertébrés (Figure 1) (Tattersall *et al.*, 2005). Chez les *Densovirinae*, quatre genres sont reconnus : *Brevidensovirus*, *Densovirus*, *Iteravirus*, et *Pefudensovirus*. Les espèces propres à chacun de ces genres se distinguent d'abord par le degré d'identité de séquence, puis par leur organisation génomique (profil de transcription mono ou ambisense), par la longueur totale du génome et par le type de structures secondaires formées par les séquences terminales (forme de T ou J).

### 2.1 La sous-famille des *Parvovirinae*

Quant à la sous-famille des *Parvovirinae*, elle se divise en cinq genres : *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* et *Bocavirus*. Les trois premiers genres comptent les espèces les mieux étudiées au sein de la famille, tandis que le genre *Amdovirus* ne compte qu'un seul membre, le virus de la maladie Aléoutienne du vison ou AMDV. Néanmoins, plusieurs souches de l'AMDV sont connues et la présence de ce virus est commune dans les populations sauvages de mustélidés et d'autres rongeurs.

#### 2.1.1 Le genre *Bocavirus*

À son origine, le genre *Bocavirus* a été ainsi désigné pour les deux espèces qui y appartenaient, le Parvovirus Bovin type 1 (BPV-1) et le Canine Minute virus (CnMV). En 2005, un groupe de chercheurs suédois a identifié un nouveau parvovirus humain à partir



**Figure 1. Phylogénie des membres de la famille des *Parvoviridae* basée sur la comparaison de la séquence de la protéine NS1.** L'arbre a été généré avec les programmes inclus dans le progiciel Phylip sur le site <http://mobyte.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py> website (ClustalW-multialign, Phylip distance matrix, PROTDIST, Neighbor-Joining method, et phylogenetic tree drawing). Le pourcentage des répliques de traçage de la phylogénie permettant le jumelage des taxons (1000 répliques) est indiqué sur la branche. La barre représente le degré de substitutions des acides aminés. Les couleurs des branches représentent les organisations génomiques semblables. L'analyse permet de distinguer les deux sous-familles des *Parvoviridae* ainsi que l'organisation monosense ou ambisense des génomes de la sous-famille des Densovirinae formant les différents genres. Les autres genres actuellement reconnus sont indiqués ainsi que la phylogénie des nouveaux parvovirus récemment identifiés. Les astérisques indiquent les clades ne portant pas le motif de phospholipase virale A<sub>2</sub>. Tiré de (Tijssen *et al.*, 2010).

d'un mélange d'échantillons des voies respiratoires (Allander *et al.*, 2005). L'organisation génomique et la présence d'une petite phosphoprotéine nucléaire (NP-1) suggéraient que ce virus serait un bocavirus humain. Par la suite, l'analyse de nombreux spécimens cliniques, issus de jeunes patients atteints d'infections respiratoires à étiologie inconnue, a révélé la présence très fréquente de ce type de virus. Depuis ces premières identifications, plusieurs autres bocavirus humains ont été identifiés dans les fèces et ceux-ci constituent diverses espèces au sein de ce genre (Chieochansin, Simmonds, et Poovorawan, 2010; Chow, Ou, et Esper, 2010; Kapoor *et al.*, 2009). De nouveaux bocavirus d'origine porcine (Blomstrom *et al.*, 2009; Zhai *et al.*) et de primates (Kapoor *et al.*, 2010; Sharp *et al.*, 2010) ont été identifiés, suggérant que ces virus sont beaucoup plus abondants que l'on ne le reconnaissait auparavant. La prochaine édition de la taxonomie et de la nomenclature de l'ICTV, attendue pour 2011, inclura officiellement les *Bocavirus Humains* 1 à 4 (Tijssen *et al.*, 2010).

### 2.1.2 Le genre *Erythrovirus*

Pour sa part, le genre *Erythrovirus* a longtemps été reconnu comme le seul des *Parvovirinae* auquel appartenait un pathogène humain, soit le B19 (Brown, 2006). Les antigènes de ce dernier avaient été détectés dans un échantillon de sérum portant le numéro de lot d'où il tire son nom (Cossart *et al.*, 1975). Par la suite, divers isolats de ce virus ont été identifiés et ont été mis en cause dans diverses pathologies, dont la cinquième maladie (Anderson *et al.*, 1983) ou *Erythema Infectiosum*, et dans les incidents de crises aplasiques chez les personnes souffrant d'anémies (Anderson *et al.*, 1982; Summers, Jones, et Anderson, 1983). Le B19 peut aussi être responsable d'anasarque foetale et foeto-placentaire (Brown *et al.*, 1984), une pathologie souvent mortelle, caractérisée par l'œdème sous-cutané du fœtus. Plusieurs autres parvovirus de primates font aussi parti du genre *Erythrovirus* et certains virus apparentés restent à être classifiés parmi ceux-ci (Mayo, 2005; Tattersall, 2006; Tijssen *et al.*, 2010). Ces virus se caractérisent par la présence d'un seul promoteur et de deux signaux de polyadénylation ainsi que des séquences terminales répétées inverses (ITR, inverted terminal repeats). Les érythrovirus ont aussi deux protéines (nommées 7.5kDa et 11kDa) n'ayant pas d'analogues chez les parvovirus ou chez les dépendovirus (Luo et Astell, 1993; St Amand et Astell, 1993; St Amand *et al.*, 1991). Aucune

fonction n'a été attribuée à la protéine 7.5kDa (Kerr et Modrow, 2006) mais la protéine 11kDa a récemment été impliquée dans l'induction de l'apoptose suite à l'infection par le B19 dans des cellules primaires érythroïdes (Chen *et al.*, 2010b; Fan *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Le genre *Dependovirus*

Le genre *Dependovirus*, comme le nom l'indique, était au départ un groupe de parvovirus qui dépendaient de la présence d'un virus auxiliaire pour leur réplication (Bowles, Rabinowitz, et Samulski, 2006). Les premiers dépendovirus ont été identifiés comme contaminants dans les préparations d'Adénovirus simiens et ont donc été nommés Adeno-Associated-Viruses ou AAV (Atchison, Casto, et Hammon, 1965). Divers virus auxiliaires ont été identifiés par la suite, notamment les virus de l'herpes simplex (HSV) (Blacklow, 1975; Buller *et al.*, 1981), les papillomavirus (Walz *et al.*, 1997) et le virus de la vaccine (Schlehofer, Ehrbar, et zur Hausen, 1986). À l'heure actuelle, il existe officiellement cinq espèces d'AAV humains (soit les types 1-5) (Mayo, 2005); plus d'une centaine de souches et de variantes d'AAV sont toutefois connues et leur classification, selon leur sérologie, selon la capacité de former des capsides chimériques ou selon la séquence de leur génome, sera sans doute révisée dans les prochaines années (Bowles, Rabinowitz, et Samulski, 2006). En effet, la prochaine édition du rapport de la taxonomie de l'ICTV devrait inclure les AAV-7, -8 et -9 comme nouvelles espèces (Tijssen *et al.*, 2010). Outre les AAVs humains, il existe des souches animales des AAVs (*i.e.* bovines, aviaires et serpents) et plusieurs espèces de dépendovirus, tels les parvovirus de l'oie (Goose parvovirus GPV) et du canard (Duck parvovirus DPV) qui ne dépendent pas de la présence de virus auxiliaires pour leur réplication. À l'instar des espèces du genre *Erythrovirus*, les dépendovirus possèdent des séquences ITR aux extrémités de leur génome. Ils comptent toutefois trois promoteurs, deux pour les protéines non-structurales (ou Rep) et un pour les protéines structurales (ou Cap) (Green et Roeder, 1980a; Green et Roeder, 1980b). En présence des protéines Rep78/68 (Surosky *et al.*, 1997), il a aussi été démontré que le génome des AAVs peut s'intégrer de façon site-spécifique au niveau du chromosome 19 dans le génome de la cellule (Kotin *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1990; Samulski *et al.*, 1991). Enfin, l'un des intérêts majeurs pour l'étude des dépendovirus est la capacité de génomes recombinants à persister de façon épisomale dans de nombreux types cellulaires (Carter, 2006). Cette caractéristique les rend particulièrement appropriés pour la thérapie génique. D'ailleurs, aucune maladie

n'est associée à l'infection par les AAVs, rendant leur utilisation sécuritaire chez l'humain. La petite taille du génome pouvant être encapsidé ( $\approx$  5kb) demeure toutefois l'un des facteurs limitant la nature des gènes pouvant être livrés par des vecteurs recombinants.

#### **2.1.4 Le genre *Parvovirus***

Le parvovirus murin MVM (minute virus of mice) est l'espèce type du genre *Parvovirus*. Au contraire des érythrovirus et des dépendovirus, les séquences terminales des génomes des membres du genre *Parvovirus* sont distinctes, de longueur différentes et se replient de façon caractéristique (Tattersall, 2006). L'extrémité gauche du génome des parvovirus se replie en forme « Y », tandis que le palindrome de droite peut se replier sur lui-même (forme allongée) ou adopter la forme d'un « T ». Les deux promoteurs, nommés P4 et P40, permettent la synthèse des protéines non-structurales (NS) et structurales (VP), respectivement (Pintel *et al.*, 1983). Les espèces du genre *Parvovirus* ont aussi une nette prédominance pour l'encapsidation du génome de polarité négative (Rhode et Klaassen, 1982; Salzman et Fabisch, 1979), à l'exception de LuIII, qui encapside le génome de chaque polarité à fréquence égale (Bates *et al.*, 1984; Diffoot *et al.*, 1989). Les autres espèces du genre sont le PPV, le parvovirus du hamster H1 (H1-PV ou H1), le parvovirus de rat Kilham (KRV), le parvovirus de souris 1 (MPV1) et les souches de la panleucopénie féline, c'est-à-dire le virus de la panleucopénie féline (FPV), le parvovirus canin (CPV), le parvovirus de raton-laveur (RPV, racoon parvovirus) et le virus de l'entérite du vison (MEV, mink enteritis virus).

## **2.2 Les nouveaux Parvovirus non-classifiés**

Le développement de nouvelles techniques d'analyse d'échantillons sanguins et cliniques a récemment entraîné la découverte de plusieurs espèces de parvovirus. En 2005, Jones *et al.* ont détecté la présence d'ADN viral, dont la séquence en acides aminés correspondante avait une similarité avec celles des parvovirus (Jones *et al.*, 2005). Le séquençage subséquent du génome entier a suggéré que ce virus appartiendrait à un nouveau genre de la sous-famille des *Parvovirinae*. La détection globale de virus

apparentés à ce parvovirus, nommé Parv4, a suggéré l'existence d'au moins trois génotypes (Fryer *et al.*, 2007a; Fryer *et al.*, 2007b; Fryer *et al.*, 2006; Simmonds *et al.*, 2008) et que ceux-ci seraient transmis entre autres par voie parentérale puisque leur prévalence est plus forte chez les utilisateurs de drogues intraveineuses et chez les personnes hémophiles (Sharp *et al.*, 2009). Deux autres virus apparentés au Parv4, soit le Hokovirus Bovin et le Hokovirus Porcin (PoHV), ont aussi été identifiés dans des échantillons d'origine bovine et porcine, respectivement, en provenance de Hong Kong (Lau *et al.*, 2008). À l'heure actuelle, la prévalence globale de ces deux virus demeure inconnue, bien qu'une étude a récemment démontré que le PoHV était présent au sein des populations de sangliers en Allemagne (Adlhoch *et al.*, 2010). Le nom *Partetravirus* a été suggéré pour ce genre (Tijssen *et al.*, 2010).

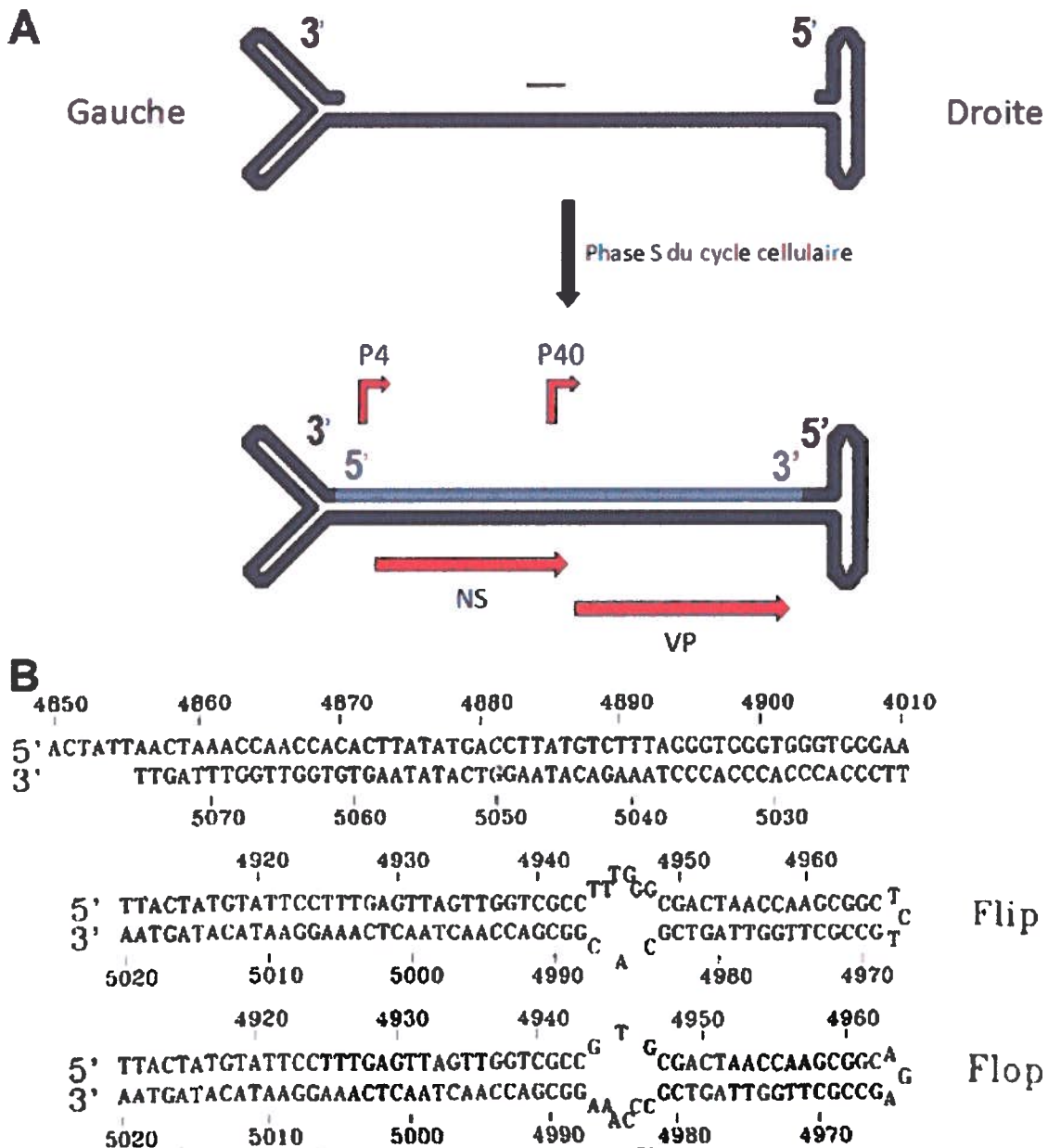
En somme, l'identification de nouveaux parvovirus au cours des dernières années à l'aide de techniques basées sur l'analyse moléculaire d'échantillons cliniques, a suscité d'importantes questions sur la prépondérance de ces derniers au sein des populations humaines et animales. En effet, les bocavirus humains sont maintenant considérés comme une cause supplémentaire de pathologies respiratoires et entériques (Chow et Esper, 2009). Pour leur part, les virus de type Parv4 ont été fréquemment retrouvés dans les produits sanguins (Fryer, Hubbard, et Baylis, 2007; Schneider *et al.*, 2008; Szelei *et al.*, 2010) et de nouvelles études ont détecté ces virus dans des échantillons provenant de personnes saines (Botto *et al.*, 2009), suggérant que ce virus est sans doute plus répandu qu'on le reconnaît actuellement. La découverte de nouveaux parvovirus au cours des cinq dernières années a donc entraîné un regain d'intérêt envers cette famille de virus méconnus.

### **3. Les composantes physiques des parvovirus**

#### **3.1 Le génome**

Les parvovirus possèdent tous des génomes d'ADN simple-brin linéaires caractérisés par la présence de séquences palindromiques aux deux extrémités. Ces répétitions de séquences sont organisées de façon à permettre le repliement des deux bouts du génome en structures d'épingle à cheveux de conformations diverses. Chez le genre *Parvovirus*, les séquences terminales du génome sont des palindromes imparfaits de

longueurs et de séquences différentes aux extrémités. Par convention, afin de simplifier la désignation des palindromes terminaux, l'extrémité 5' du brin codant pour les protéines NS est nommée l'extrémité gauche, tandis que le palindrome opposé constitue de l'extrémité droite (Cotmore et Tattersall, 1987; Rhode, 1977). Les protéines NS sont donc issues du cadre de lecture dans la moitié gauche du génome et le gène des protéines de la capsid se trouve dans la moitié droite. Puisque la plupart des membres du genre *Parvovirus* encapsident le génome de polarité négative (à l'exception de Lull), le brin non-codant est généralement schématisé, et les extrémités 3'-OH et 5'-P du génome se trouvent du côté gauche et du côté droit, respectivement (Figure 2A). L'organisation des séquences répétées à l'extrémité gauche permet le repliement du génome en « Y », caractérisé par un « tronc » et deux branches, nommée la conformation repliée ou en oreilles de lapin. Une bulle formée de deux ou trois nucléotides de part et d'autre du tronc joue un rôle important dans la réplication du génome. Ce palindrome est court, variant entre 115-121 nucléotides chez les différentes espèces (Tattersall, 2006) et a une taille de 117 nucléotides chez le PPV (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Pour sa part, le palindrome de droite peut adopter une forme repliée en « T » (*i.e.* forme de croix) ou une forme allongée où seuls trois des nucléotides ne sont pas appariés et, comme à l'autre bout du génome, la transition entre les diverses formes est régulée au cours de la réplication. La longueur du palindrome de droite varie entre 200 et 248 nucléotides et contient 220 nucléotides chez le PPV (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Une bulle de trois nucléotides est retrouvée sur l'un des brins du génome du MVM tandis que chez le PPV, cette bulle porte six nucléotides d'un côté et trois de l'autre. Ces nucléotides correspondent aux séquences formant les bouts de la barre du « T » en conformation repliée et leur orientation détermine les versions nommées « Flip » et « Flop » des extrémités (Figure 2B). Le mécanisme de réplication du génome entraîne le changement des orientations Flip et Flop à chaque ronde de duplication. Ainsi, dans une population donnée de parvovirus, la moitié des génomes portent l'orientation Flip et l'autre, l'orientation Flop. En principe, la présence d'une bulle à l'extrémité gauche permet aussi de distinguer des orientations Flip et Flop. Le mécanisme de réplication de ce palindrome entraîne toutefois l'excision d'une seule orientation, discuté plus en détails dans la section traitant spécifiquement de la réplication du génome. Pour simplifier la nomenclature des différentes régions du génome des parvovirus, la position des promoteurs est désignée en unités de cartographie (map units) selon laquelle le brin codant compte 100 unités au total. Chez les espèces du genre *Parvovirus*, le promoteur des protéines NS se trouve en position



**Figure 2. Organisation du génome des Parvovirus.** **A.** Schéma de la structure du génome de polarité négative avec les palindromes de gauche (extrémité 3'-OH du génome) et de droite (extrémité 5'-P du génome). Par convention de nomenclature, l'extrémité gauche porte la région 5' du gène des protéines non-structurales (NS) tandis que la moitié droite du génome porte le gène des protéines structurales (VP). Chez les membres du genre *Parvovirus* les promoteurs de ces gènes se situent aux positions P4 et P40, respectivement. **B.** Repliement du palindromes de droite du PPV en conformation allongée entraîne la formation d'une bulle de six et de trois nucléotides mal-appariés. L'orientation des nucléotides de la bulle détermine les orientations « Flip » et « Flop » du génome. La séquence illustrée est celle du génome de polarité positive (brin codant). Tiré de (Bergeron *et al.*, 1993).



P4 (donc à 4% de l'extrémité gauche du génome) et le promoteur des protéines VP est en position  $\approx$  P40 (P38-P40, chez les différentes espèces), soit à 40% de l'extrémité gauche.

### 3.1.1 Organisation du génome : profil de transcription

L'organisation du génome des *Parvovirinae* est relativement simple : ils possèdent deux grands cadres de lecture ouverts et quelques-uns plus petits qui se superposent (Qiu *et al.*, 2006b). Due à la petite taille de leur génome (environ 5kb), ces virus utilisent divers patrons d'épissage alternatif afin d'augmenter leur capacité codante (Pintel *et al.*, 1983). L'expression des gènes se fait à partir d'un, de deux ou de trois promoteurs, régulés de façon temporelle, qui entraînent la synthèse précoce des protéines NS et l'expression plus tardive des protéines VP (Clemens et Pintel, 1988). Des différences notables existent toutefois au niveau des stratégies d'épissages entre les divers genres de la sous-famille des *Parvovirinae* (Chen *et al.*, 2010a; Green et Roeder, 1980b; Qiu *et al.*, 2006a; Shade *et al.*, 1986) et l'organisation génomique des *Densovirinae* diffèrent encore davantage de ceux-ci. En effet, le génome des virus des genres *Densovirus* et *Pefudensovirus* sont organisés de façon ambisense, la séquence des gènes codant pour les protéines NS et VP étant sur les brins opposés (Guo, Zhang, et Hu, 2000; Tijssen *et al.*, 2003; Yamagishi *et al.*, 1999). La description suivante se limite donc aux profils de transcription des espèces du genre *Parvovirus*.

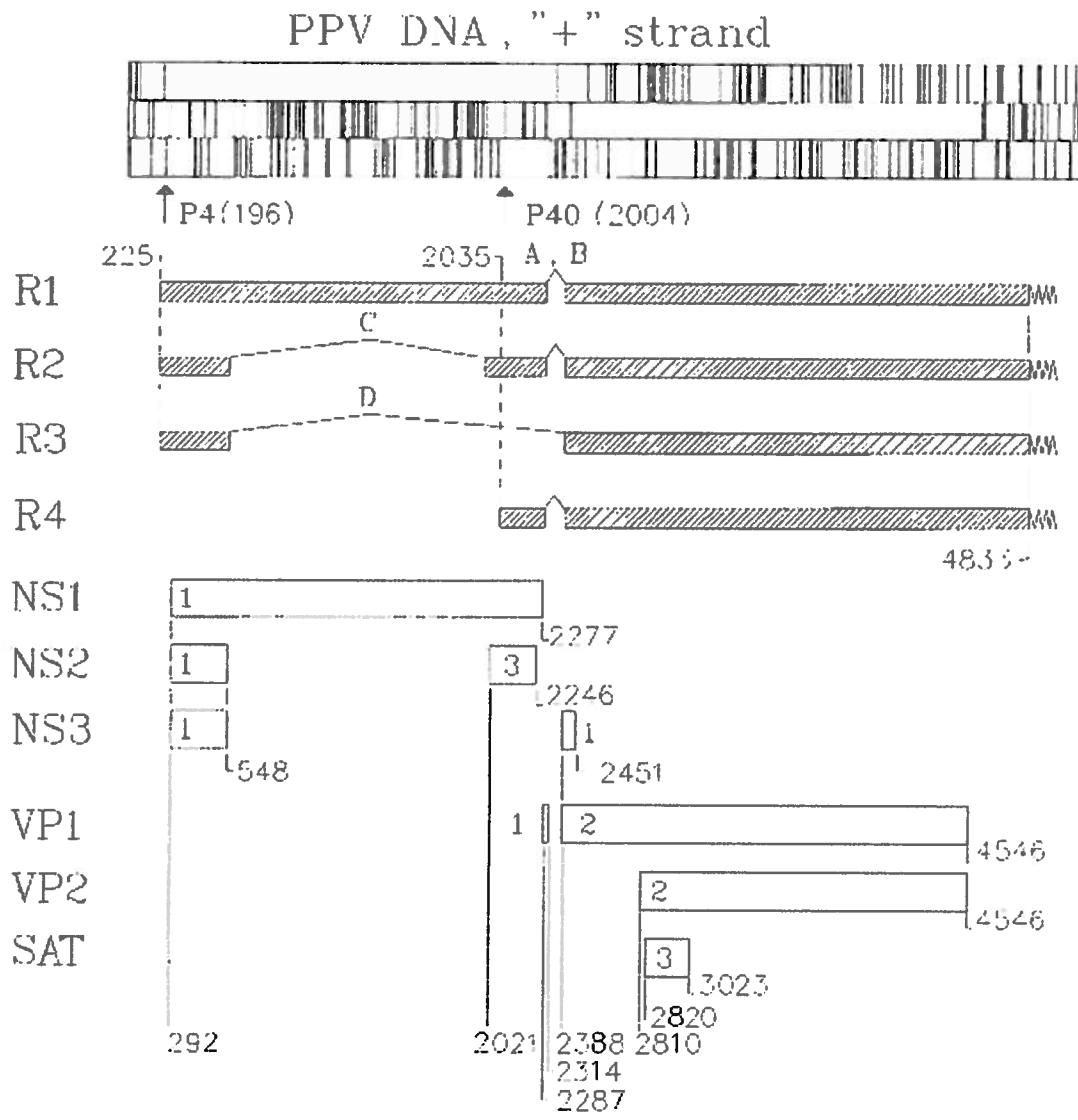
Chez les parvovirus, les deux promoteurs (P4 et P40) se situent en amont d'un petit intron, qui est épissé dans tous les transcrits suite à la polyadénylation (Jongeneel *et al.*, 1986; Pintel *et al.*, 1983). Chez les parvovirus de rongeurs MVM et H-1, il existe deux sites donneurs (D1 et D2) et deux sites accepteurs (A1 et A2) pour l'épissage de cet intron (Jongeneel *et al.*, 1986; Lebovitz et Roeder, 1986; Morgan et Ward, 1986). Chez le PPV et le CPV, un seul site accepteur a été identifié (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Reed, Jones, et Miller, 1988). Un grand intron peut aussi être excisé des transcrits initiés au promoteur P4, produisant le transcrit R2 (Cotmore et Tattersall, 1986b; Cotmore et Tattersall, 1990). Enfin, bien que la transcription des divers ARNm soit initiée à deux endroits dans le génome des membre du genre *Parvovirus*, les transcrits sont polyadénylés

avant l'épissage au niveau d'une séquence présente près de l'extrémité droite du génome, et sont exportés du noyau suivant l'ajout d'une coiffe (Clemens et Pintel, 1987).

### 3.1.2 Profil de transcription du PPV

#### 3.1.2.1 Transcription à partir du promoteur précoce P4

Chez le PPV, trois ARNm peuvent être générés à partir du promoteur P4 (Figure 3) (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Le transcrit R1, codant pour la protéine NS1, n'est épissé qu'au niveau du petit intron (nucléotides 2281 à 2388). L'utilisation de l'un ou de l'autre des sites donneurs pour l'épissage n'a pas d'influence sur la séquence de la NS1 puisque le codon terminal de cette protéine se situe en amont de ces sites (patrons d'épissage A ou B, Figure 3) (Tijssen *et al.*, 1995). L'épissage supplémentaire de R1 au niveau du grand intron (nucléotides 548-2021 chez le PPV, patron d'épissage C, Figure 3) permet de joindre le premier exon (premier cadre de lecture ouvert) à un petit exon dans le troisième cadre de lecture ouvert. Ce deuxième transcrit, R2, permet la synthèse de la petite protéine non-structurale NS2 (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Par conséquent, les protéines NS ont la même séquence en acides aminés dans leur région N-terminale, soit l'une des particularités des parvovirus (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Cotmore et Tattersall, 1986b; Pintel *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1998). Par ailleurs, chez le MVM, l'efficacité de l'épissage différentiel entre les sites D1/D2 et A1/A2 du petit intron est à l'origine de l'existence de trois isoformes de NS2 (Haut et Pintel, 1998; Haut et Pintel, 1999; Pintel *et al.*, 1995) : l'isoforme majeur NS2-P (D1-A1), l'isoforme mineur NS2-Y (D2-A1/A2) et l'isoforme rare NS2-L (D1-A2) (Figure 4A, en bas). Chez le PPV (et le CPV), il n'existe qu'un seul isoforme de NS2 puisque le codon terminal de la protéine se situe en amont du site D1 du petit intron (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Enfin, une situation unique est retrouvée chez le PPV puisqu'un troisième transcrit (R3) permettrait la traduction d'une protéine NS3 (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). L'épissage serait effectué entre le nucléotide 548 et l'accepteur du petit intron (patron d'épissage D, Figure 3). La séquence des 86 premiers acides aminés de NS3 serait donc identique à celles des protéines NS1 et NS2, tandis que les 20 résidus de sa région C-terminale lui seraient uniques. L'existence de la protéine NS3 n'a été jamais été confirmée *in vivo* ou *in vitro*. Il est possible que cette protéine ne soit essentielle que dans certains types cellulaires et ce, à de très faibles niveaux (Tijssen *et al.*, 1995).



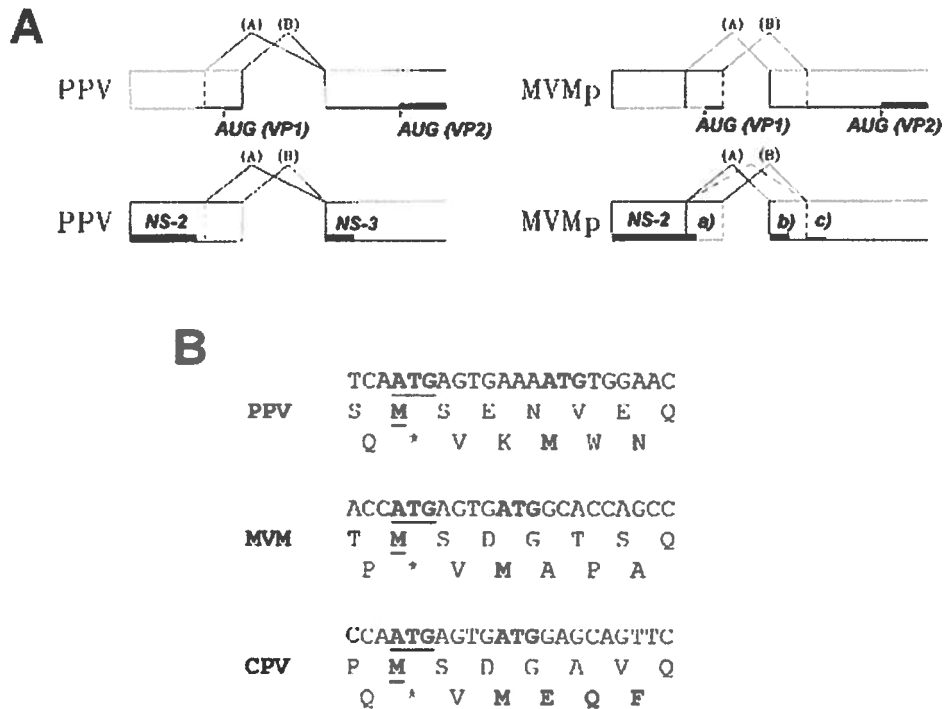
**Figure 3. Organisation du génome et profil de transcription du PPV.** Le génome du PPV possède deux grands cadres de lecture ouvert et de nombreux plus petits qui se superposent. Les deux promoteurs se trouvent aux nucléotides 196 (P4) et 2004 (P40). Un seul transcrit (pré-ARNm, non illustré) est généré par le P4 au nucléotide 225 et polyadénylés au nucléotide 4833. L'excision du petit intron (A-B) génère le transcrit R1, codant pour la protéine NS1. L'épissage supplémentaire du transcrit R1 au niveau du grand intron (C) génère le transcrit R2, codant pour la protéine NS2. Le transcrit R3 est généré par épissage entre le donneur du grand intron et l'accepteur du petit intron (D), et permet la synthèse de la protéine NS3. Un seul transcrit est généré à partir du P40 (nucléotides 2035-4833) et n'est épissé qu'au niveau du petit intron (A-B). Le choix des sites donneurs pour cet intron détermine la production de VP1 ou de VP2 (Figure 4A). Une petite protéine NS tardive (SAT) peut aussi être traduite à partir de l'ARNm R4 épissé pour la production de VP2 (Figure 4B). Les extrémités des cadres de lecture ouverts et la position des sites d'épissages sont indiquées. Tiré et modifié de (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993).

### 3.1.2.2 Profil de transcription à partir du promoteur tardif P40

Les protéines structurales VP1 et VP2 sont traduites à partir de R4 chez le PPV, le seul transcrit généré à partir du promoteur tardif P40 (ou P38 chez le MVM) (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Jongeneel et al., 1986; Labieniec-Pintel et Pintel, 1986; Tattersall, Shatkin, et Ward, 1977). La transcription débute au nucléotide 2035, en amont du petit intron, et se termine au site de polyadénylation au 4833<sup>e</sup> nucléotide, comme les ARNm transcrits à partir du promoteur P4 (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). L'épissage alternatif du petit intron génère deux formes d'ARNm matures pour la synthèse des protéines structurales. L'utilisation du site D1 au nucléotide 2287 lors de l'épissage entraîne l'excision du codon de départ AUG de la VP1 (profil A en haut, Figure 4A). Ce profil d'épissage est prédominant lors de l'infection par le PPV de sorte que la protéine VP2, dont le codon d'initiation est situé au nucléotide 2810, est traduite de façon préférentielle. À l'opposé, l'utilisation du deuxième site donneur D2 (nucléotide 2314) pour l'épissage du petit intron permet de conserver l'AUG nécessaire à la synthèse de la VP1 mais en quantité moindre que la VP2 (profil B en haut, Figure 4A) (Tijssen *et al.*, 1995). Enfin, l'existence d'une protéine non-structurale tardive, traduite à partir des ARNm R4, a récemment été démontrée chez le PPV (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005). En effet, tous les membres du genre *Parvovirus* et les parvovirus apparentés au PARV4 ont un petit cadre de lecture ouvert superposé à celui des protéines VP, permettant la synthèse d'une petite protéine de 50 à 68 acides aminés. Le codon d'initiation de la protéine SAT (small alternatively translated) se situe à sept nucléotides en aval de celui de la VP2 chez le PPV ou à quatre nucléotides chez les autres parvovirus (Figure 4B). Bien que le mécanisme précis de l'initiation de la traduction de la SAT n'ait pas été déterminé, il a été suggéré que le contexte défavorable (aux positions -3 et +1) du codon d'initiation de VP2 permettrait à une partie des ribosomes 40S de se lier à celui de la SAT plutôt qu'au premier AUG, selon l'exception à la règle proposée par Kozak par le mécanisme de « leaky scanning » (Kozak, 1995).

### 3.1.3 Régulation de l'épissage

La régulation des patrons d'épissage alternatif des ARNm chez les parvovirus est un processus complexe qui résulte d'un équilibre entre les signaux d'épissage à l'intérieur des



**Figure 4. Profil d'épissage du petit intron (A) et de la traduction de la protéine SAT chez différents Parvovirus (B).** A. L'épissage du transcrit R4 (haut) selon A est majoritaire et permet la traduction de VP2 (et de SAT), tandis que l'épissage selon B entraîne la synthèse de la protéine minoritaire de la capside VP1. Le profil d'épissage du petit intron du pré-R1 (en bas) n'a pas d'influence sur la séquence de NS2 chez le PPV puisque le codon de terminaison de NS2 se situe en amont des sites pour l'épissage du petit intron. Chez le MVM, l'épissage du petit intron entraîne la formation de trois isoformes de NS2 qui diffère au niveau de leur région C-terminale. L'efficacité de l'épissage détermine la production de la forme majoritaire, NS2-P, de la forme minoritaire NS2-Y et de la forme rare NS2-L selon l'utilisation des profils a, b et c, respectivement. Tiré de (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). B. Le codon d'initiation de la SAT (en gras) se situe à quatre nucléotide en aval de celui de la VP2 (en gras souligné) chez la plupart des *Parvovirus* (exemple donné MVM et du CPV). Chez le PPV, ce codon se situe à sept nucléotides en aval de celui de la VP2. Tiré et modifié de (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005).

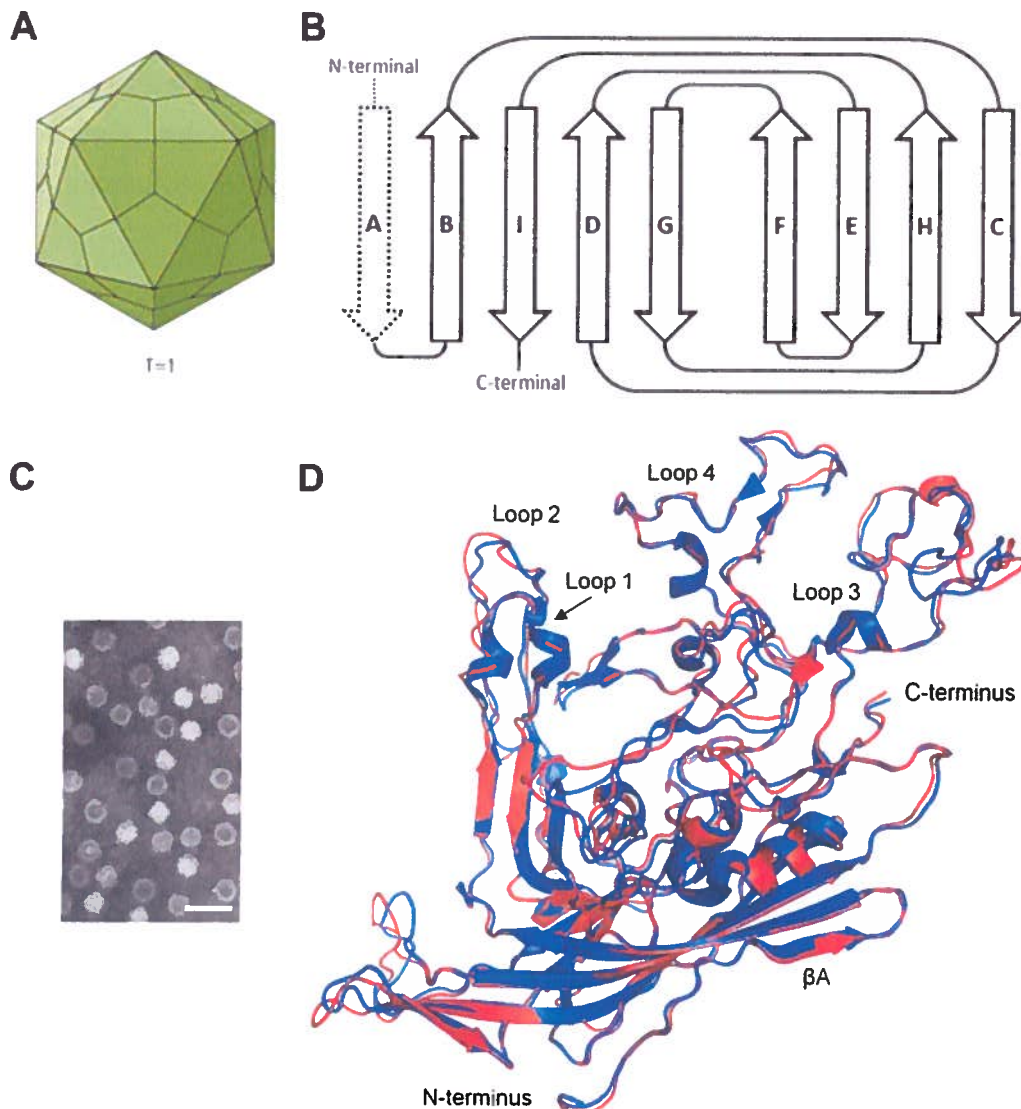
introns et aux extrémités des exons (Pintel *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 2006b). Suite à la polyadénylation, la première étape de la maturation des ARNm est l'excision du petit intron (Clemens et Pintel, 1988). Puisque l'accepteur A1 a une plus forte identité aux séquences consensus et que la position du donneur D1 est plus favorable à l'excision de l'intron (Haut et Pintel, 1998; Morgan et Ward, 1986), la majorité des transcrits sont épissés en utilisant la combinaison des sites D1-A1 chez le MVM (D1-A chez le PPV). Ceci entraîne la production de l'isoforme majeur NS2 à partir du transcrit R2 et de la VP2 avec le transcrit R4. L'épissage minoritaire à partir du site D2 (permettant la synthèse de l'isoforme mineur de NS2 et de VP1 à partir des transcrits R2 et R4, respectivement) est rendu plus favorable par la présence d'un « stimulateur » d'excision (intron splice enhancer, IES) au niveau du petit intron et par la haute identité de D2 à la séquence consensus (Haut et Pintel, 1998; Zhao, Schoborg, et Pintel, 1994). De plus, la liaison de la machinerie d'épissage à cette séquence IES permet aussi de favoriser l'inclusion de l'exon spécifique à NS2 lors de l'épissage du grand intron (Haut et Pintel, 1999; Zhao, Gersappe, et Pintel, 1995), ce qui empêcherait la production d'un transcrit R3 observé chez le PPV. Par ailleurs, les séquences présentes à l'extrémité 3' du grand intron diffèrent dans deux souches de MVM, soit MVMp et MVMi (Choi *et al.*, 2005; Choi et Pintel, 2009; Sahli, McMaster, et Hirt, 1985). L'efficacité de l'épissage de R2 est donc facilitée chez l'une ou l'autre de ses souches, selon le type de cellulaire, ce qui altère le ratio des protéines NS1 et NS2 au cours de l'infection. Ceci constitue l'un des mécanismes qui contribue à l'allotropisme des souches du MVM (Brownstein *et al.*, 1992; Gardiner et Tattersall, 1988b; Naeger, Cater, et Pintel, 1990).

### **3.2 Structure de la capsidie des parvovirus**

Agissant à priori à titre de barrière protectrice du génome, la capsidie des parvovirus joue des rôles à de nombreuses étapes du cycle de réplication, notamment au niveau de l'attachement et du transport jusqu'au noyau. Les parvovirus sont parmi les plus petits virus connus et leur capsidie porte un nombre de triangulation  $T=1$ , soit la forme la plus simple correspondant à un icosaèdre (Figure 5A) (Caspar et Klug, 1962). Bien que la séquence des gènes de la capsidie des membres de la famille des *Parvoviridae* varie largement, le repliement des protéines structurales est fortement conservé (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006). La comparaison de plusieurs capsides des membres des *Densovirinae*, a toutefois permis d'observer l'inversion de l'orientation des régions N-terminales

des protéines par rapport à celles des *Parvovirus* (Kaufmann *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 1998). L'une des exceptions étant la capsidite du densovirus *Aedes albopictus* C6/36 dont la structure ressemble plus à celle du virus B19 qu'à celle des autres densovirus tels que *GmDNV* ou *PstDNV* (Cheng *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2007; Kaufmann, Simpson, et Rossmann, 2004).

Chez les membres du genre *Parvovirus*, les capsides ont un diamètre d'environ 25 nm, formées majoritairement par la protéine VP2, ou de sa version tronquée, la protéine VP3 (Tsao *et al.*, 1991). Les capsides sont denses (1.39-1.45g/cm<sup>3</sup>) et très stables (Tattersall *et al.*, 2005), permettant la résistance aux températures élevées (jusqu'à 75°C aux pH physiologiques ou légèrement acides) (Hernando *et al.*, 2000), aux pH supérieurs à 11 pendant plus d'une heure (Boschetti *et al.*, 2003), aux solvants organiques et détergents (Tattersall *et al.*, 2005; Tijssen *et al.*, 2010) et à l'action de plusieurs protéases (Weichert *et al.*, 1998). La structure de plusieurs parvovirus a été déterminée par cristallographie, ce qui a permis l'identification de caractéristiques communes (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Agbandje *et al.*, 1993; Chapman et Rossmann, 1996; Simpson *et al.*, 2002; Tsao *et al.*, 1992; Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996). Le repliement de chacune des protéines structurales forme des barils- $\beta$ , dans lesquels huit brins antiparallèles sont juxtaposés pour former deux feuillets- $\beta$  (BIDG et CHEF), dont l'organisation théorique est présentée à la Figure 5B (Tsao *et al.*, 1991). Une particularité commune à tous les parvovirus est l'existence d'un neuvième brin (A) qui forme des ponts hydrogènes avec le brin B (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006). Chez les densovirus *GmDNV* et *PstDNV*, l'orientation des brins A et B est inversée, ce qui les distingue des autres parvovirus, tel que mentionné ci-haut (Kaufmann *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 1998). Chez le CPV, le MVM et le PPV, le brin C est en fait formé de deux petites sections, séparées par trois acides aminés (Simpson *et al.*, 2002; Xie et Chapman, 1996). Les brins composant le feuillet BIDG chez les parvovirus sont longs et se situent près de la surface interne de la capsidite tandis que le feuillet CHEF est plus court et se replie sur le premier feuillet pour former le « baril » (Figure 5D). Par ailleurs, les boucles qui relient chacun des brins sont de longueurs variables, soit entre cinq et 72 acides aminés. L'exception est la très longue boucle GH qui compte 220 résidus chez le PPV, ce qui est comparable aux autres membres du genre *Parvovirus* (Simpson *et al.*, 2002; Xie et Chapman, 1996). Ainsi, près de 80% des acides aminés des protéines VP forment les boucles qui se retrouvent près de la surface externe des capsides (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006). Ces séquences sont faiblement conservées entre

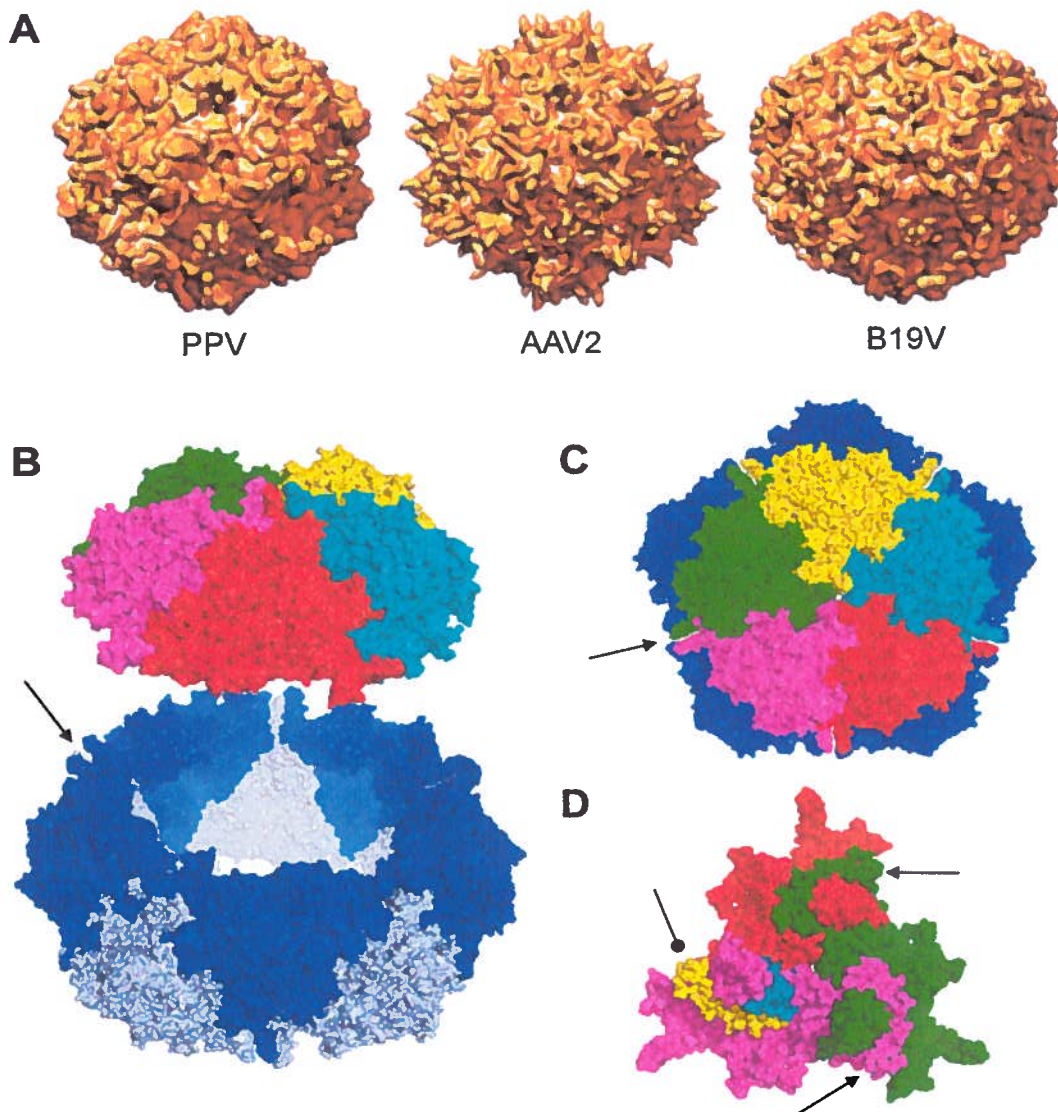


**Figure 5. Repliement des protéines structurales dans la capsid.** **A.** Schéma de la symétrie T=1 de la capsid des parvovirus. Tiré de (Bioinformatics, 2010) **B.** Organisation des deux feuillets- $\beta$  (BIDG et CHEF) de chacune des protéines VP, formés de huit brin- $\beta$  antiparallèles (B- I à partir de l'extrémité N-terminale). Chez les parvovirus, un neuvième brin (A) est positionné à proximité du brin B. Tiré de (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006). **C.** Micrographie électronique en contraste négatif de capsides du PPV. La barre correspond à 50nm. Tiré et modifié de (Tijssen *et al.*, 2010) **D.** Superposition des structures repliées des protéines VP2 du MVM (en rouge; 549 acides aminés, PDB 1mvm) et du PPV (en bleu; 542 acides aminés, PDB 1k3v). Les séquences des protéines VP2 ne comptent que 52% d'identité bien que 97% des paires de résidus (528 a.a.) occupent la même position dans la structure repliée (RMSD = 1.0). Le baril- $\beta$  forme la structure interne de la capsid tandis que les boucles de longueur variable (comportant environ 80% des acides aminés des protéines VPs) forment la surface externe. La très longue boucle GH est divisée en sous-boucles (3 et 4). Tiré de (Tijssen *et al.*, 2010).



les différentes espèces et sont responsables de la structure antigénique distincte de chacun (Agbandje-McKenna et al., 1998; Hernando et al., 2000; Kontou et al., 2005; Llamas-Saiz et al., 1996; Simpson et al., 2000; Simpson et al., 2002; Truyen, Agbandje, et Parrish, 1994). En revanche, malgré la faible conservation des séquences, ces boucles forment les structures caractéristiques de la surface des capsides des parvovirus (Figure 6A) (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006).

Au niveau des axes de symétrie 3, les boucles GH de protéines adjacentes contribuent à la formation de protubérances, nommées spicules, sur la surface de la capsid (Figure 6A) (Tsao et al., 1991). Chez le CPV et le FPV, les spicules ont un diamètre de 70Å et une hauteur de 22Å; les acides aminés qui les composent sont impliqués dans la liaison au récepteur à la surface cellulaire, soit le récepteur de la transferrine (TfR) (Chang, Sgro, et Parrish, 1992; Govindasamy et al., 2003; Hueffer et al., 2003; Parker et Parrish, 1997; Simpson et al., 2000). Les régions analogues de la capsid du MVM portent aussi des résidus impliqués dans le tropisme des diverses souches de chacun de ces virus (Agbandje-McKenna et al., 1998; Ball-Goodrich et Tattersall, 1992; Gardiner et Tattersall, 1988b). D'autre part, au niveau des axes de symétrie 2 se trouvent des fossettes, soit des dépressions à la surface des capsides (Tsao et al., 1991). Les résidus présents dans la région de la fossette permettent la liaison à l'acide sialique, responsable de l'activité d'hémagglutination observée chez plusieurs parvovirus (Barbis, Chang, et Parrish, 1992; Lopez-Bueno et al., 2006; Tresnan et al., 1995). Au niveau des axes de symétrie 5 se trouvent des protubérances entourées d'une dépression : les canyons (Chapman et Rossmann, 1993; Tsao et al., 1991). Un pore, formé par le repliement des régions N-terminales riches en glycines des protéines structurales, est aussi présent au niveau l'axe de symétrie 5 (Figure 6 B-C) (Wu, Keller, et Rossmann, 1993; Wu et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996). Ce pore est indispensable pour l'encapsidation du génome et pour l'externalisation des régions N-terminales de VP2 et de la région unique de VP1 (Agbandje-McKenna et al., 1998; Chapman et Agbandje-McKenna, 2006; Chapman et Rossmann, 1996; Farr et Tattersall, 2004; Xie et Chapman, 1996). Enfin, selon les différences dans la stabilité et le degré d'interaction entre les sous-unités protéiques, il a été proposé que les premiers intermédiaires d'assemblage de la capsid soient des trimères (Figure 6D) ou possiblement des pentamères, formés de trois ou cinq copies des protéines VP, respectivement (Chapman et Agbandje-McKenna, 2006; Xie et Chapman, 1996; Yuan et Parrish, 2001).



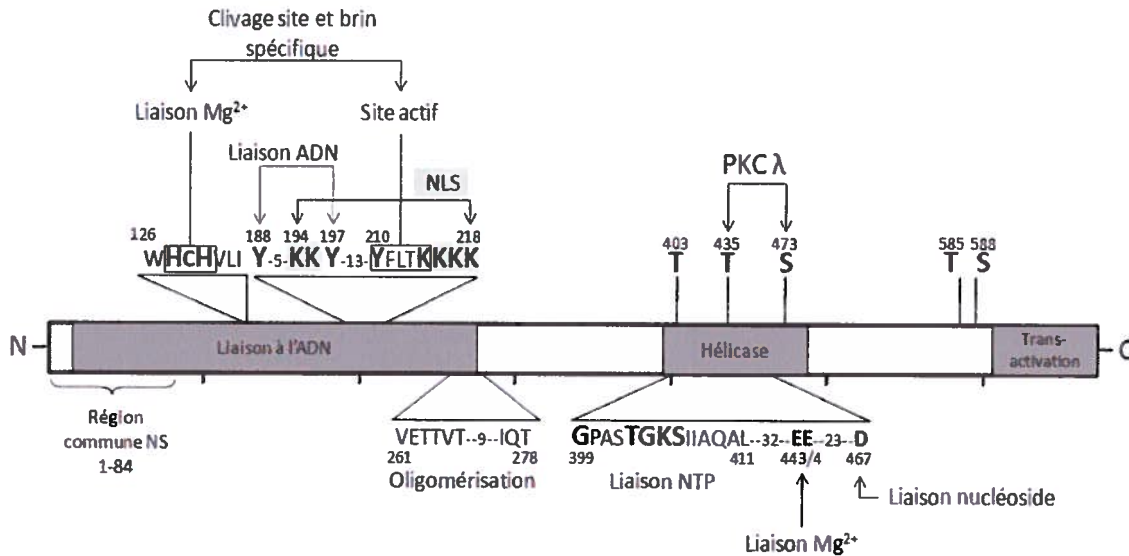
**Figure 6. Morphologie des capsides des parvovirus.** **A.** Structures des capsides du PPV, du Dependovirus AAV-2 (PDB 1LP3) et de l'Erythrovirus Humain B19 (B19V; PDB: 1S58), illustré par CHIMERA à une résolution de 4Å. **B.** Schéma de la capside du PPV où les cinq trimères supérieurs sont décalés de 120Å le long de l'axe de symétrie 5 à partir des 10 trimères formant la partie centrale de la capside (colorés en bleu pâle et foncé en alternance). Les cinq trimères inférieurs ne sont pas illustrés. Les axes de symétrie 5 sont localisés à l'intersection de cinq trimères (la flèche indique l'axe de symétrie 5 à la jonction des trimères magenta, vert, bleu pâle et 2 bleus foncés). **C.** Vue plongeante sur les cinq trimères décalés en (A), illustrant le pore formé à l'intersection des trimères. **D.** Structure d'un trimère formé par le repliement des protéines VP. La flèche indique les enchevêtrements des boucles GH d'une sous-unité avec la sous-unité avoisinante. Les boucles GH (flèche pointe ronde) sont formées par les sous-boucles 3 et 4 (jaune et turquoise, respectivement). Les modèles B-D ont été tracés en utilisant PyMol et CHIMERA. Tiré et modifié de (Tijssen *et al.*, 2010).

## 4. Rôles des protéines

### 4.1 La protéine NS1

La protéine NS1 est absolument requise dans toutes les cellules pour la réplication des *Parvovirus* (Nüesch, 2006). Les diverses fonctions de la protéine sont essentielles tout au long du cycle de réplication, tant pour la réplication du génome (Rhode, 1989) que l'activation du promoteur tardif (Rhode, 1985) et les effets cytotoxiques développés au cours de l'infection (Brandenburger *et al.*, 1990). Chez le PPV, la protéine NS1 est le produit de l'ARNm R1, le transcrit de 4,7kb initié au promoteur P4 et épissé uniquement au niveau du petit intron (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Le codon terminal de la protéine (nucléotide 2278-TAA) se situe immédiatement en amont du premier site donneur pour l'épissage du petit intron (nucléotide 2280) qui n'influe donc pas sur la séquence protéique (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). La masse moléculaire théorique de la protéine de 662 acides aminés est de 75,5 kDa (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Brandenburger *et al.*, 1990), mais les modifications post-traductionnelles entraînent une masse apparente de 84-86 kDa selon l'état de phosphorylation de la protéine (Molitor, Joo, et Collett, 1985). La majorité des recherches portant sur la dissection des divers domaines fonctionnels sont basées sur l'étude de la NS1 du MVM. Toutefois, la séquence de cette protéine a environ 80% de similarité avec celle du PPV, ce qui suggère que la plupart de ses fonctions essentielles sont conservées (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996; Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993).

Les domaines de la protéine NS1 sont répartis sur l'ensemble de sa séquence (Figure 7), la majorité de ses fonctions étant impliquées directement dans la réplication du génome. Seule la partie C-terminale de la protéine est nécessaire pour trans-activer le promoteur des protéines VP (Legendre et Rommelaere, 1994). L'étude de la stabilité des protéines a déterminé que la demi-vie de la NS1 est longue de sorte qu'elle est présente en quantité importante, même après la diminution de l'activation du promoteur P4 (Cotmore et Tattersall, 1990; Schoborg et Pintel, 1991). La NS1 exerce la plupart de ses fonctions au niveau du noyau et la protéine est rapidement relocalisée à ce compartiment après sa synthèse (Cotmore et Tattersall, 1986a; Rhode et Paradiso, 1989). Le signal de localisation nucléaire (NLS) riche en résidus lysines est bipartite et se situe à l'intérieur de domaine de liaison à l'ADN (Nuesch et Tattersall, 1993). Il a été démontré que la protéine forme des



**Figure 7. Domaines fonctionnels de la protéine NS1 du MVM.** Les divers domaines sont répartis le long de la séquence de la protéine NS1 du MVM (672 acides aminés). Le domaine de liaison à l'ADN est situé dans sa région N-terminale (résidus 16-275). Ce domaine comprend la région commune des protéines NS, le site d'endonucléase site-spécifique incluant la tyrosine en position 210 qui forme un lien covalent avec l'ADN clivé et le NLS (gris pâle, résidus basiques formant le NLS indiqués en gras). Les résidus critiques se lient spécifiquement aux ions métalliques, aux acides nucléiques et formant les sites catalytiques du domaine de liaison à l'ADN sont indiqués en gras. Le site nécessaire à l'oligomérisation des NS1 est situé à l'extrémité du domaine de liaison à l'ADN et celui-ci est absolument essentiel pour les diverses fonctions de la protéine. Le domaine hélicase a une haute similarité avec celui de l'antigène « T » du SV40 et comprend le site de liaison des NTPs ou les résidus critiques à l'activité de la protéine sont indiqués en gras. Plusieurs résidus ciblés par les PKC se trouvent au niveau du motif hélicase sont identifiés en gras au dessus du domaine. Le domaine de *trans*-activation se situe à l'extrémité C-terminale de la protéine. La position des résidus Y585 et S588, impliqués dans la régulation des activités cytotoxiques est indiquée en gras. Voir le texte pour plus de détails. Tiré et modifié de (Cotmore et Tattersall, 2006).

oligomères suite à sa synthèse au cytoplasme puisque le transport nucléaire des protéines NS1 mutées au niveau du NLS peut être complété par l'ajout de la protéine sauvage (Nuesch et Tattersall, 1993). Le motif VETTVT(X<sub>9</sub>) IQT permettant l'oligomérisation des protéines NS1 est absolument conservé au sein du genre *Parvovirus* (Pujol *et al.*, 1997). D'ailleurs, le blocage de ce motif à l'aide de peptides artificiels abolit l'activité hélicase de NS1 et empêche la réplication du génome viral, suggérant que l'oligomérisation de la protéine est nécessaire à ses fonctions (Pujol *et al.*, 1997).

Les protéines NS1 de divers parvovirus ont une forte similarité avec les domaines hélicase et ATPase de l'antigène « T » du virus SV40 (Astell, Mol, et Anderson, 1987; Wilson *et al.*, 1991). Les substitutions au niveau des résidus critiques du motif conservé (G/A)XXXXGK(S/T) ont permis de démontrer que cette région constitue le domaine de liaison aux NTPs (Astell, Mol, et Anderson, 1987; Cotmore *et al.*, 1995; Nuesch, Cotmore, et Tattersall, 1992) qui est d'ailleurs essentielle à l'activité hélicase (Jindal *et al.*, 1994). La lysine 405 (K405) et l'acide aspartique 467 lient le phosphate et le nucléoside, respectivement, tandis que les deux glutamates (EE) aux positions 443 et 444 permettent la liaison des ions métalliques nécessaires à l'hydrolyse (Jindal *et al.*, 1994; Nuesch, 2006). Tels que décrit dans la section sur la réplication du génome, la fonction hélicase-dépendante de l'ATP est essentielle à plusieurs étapes de ce processus, particulièrement pour le déroulement des structures en épingles aux extrémités du génome (Nuesch, Cotmore, et Tattersall, 1992). Étonnamment, les substitutions de la K405 de la NS1 entraînent aussi une diminution de la capacité de la protéine à trans-activer le promoteur tardif (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1995; Nuesch, Cotmore, et Tattersall, 1992), bien que le domaine de trans-activation soit situé à l'extrémité C-terminale de la protéine (Legendre et Rommelaere, 1994). Ainsi, l'affinité de la liaison entre la NS1 et l'ADN au niveau de l'élément *tar* (trans-activation response) en amont du promoteur P38 est stimulée par la liaison à l'ATP (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1995). Il a été suggéré que la liaison du nucléotide facilite l'oligomérisation des protéines NS1 et que seules les formes multimériques ont la capacité de stimuler la transcription (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1995; Deleu *et al.*, 2001). La trans-activation du promoteur tardif requiert toutefois la présence de plusieurs facteurs de transcription, dont Sp1 (Ahn, Pittluk, et Ward, 1992; Gu, Chen, et Rhode, 1992; Gu et Rhode, 1992). Enfin, la protéine NS1 régule aussi la transcription à partir de son propre promoteur en interagissant avec les structures en épingles (Hanson et Rhode, 1991).

Le plus gros domaine fonctionnel de la NS1 est celui de liaison à l'ADN et comprend les résidus 1 à 275 de la protéine. Ces acides aminés sont impliqués dans la liaison site-spécifique à l'ADN double-brin, à la liaison non-spécifique à l'ADN simple-brin et à l'ARN (Mouw et Pintel, 1998). Les acides aminés 1-16 sont toutefois facultatifs à la liaison site-spécifique, bien que leur présence augmente l'affinité de la liaison. La NS1 se lie aux séquences 5'-TGGT-3' en tandem réparties sur l'ensemble du génome (Cotmore, Gottlieb, et Tattersall, 2007), anciennement identifiées comme les séquences [5'-ACCA-3']<sub>2-3</sub> (Cotmore et al., 1995). Ces séquences sont présentes aux deux extrémités du génome, au niveau des origines de réplication (Willwand *et al.*, 2002) et aux éléments *tar* (Rhode et Richard, 1987). L'affinité de liaison de la NS1 est variable aux différents sites, et seuls quelques-uns sont stimulés par la présence d'ATP (Cotmore, Gottlieb, et Tattersall, 2007). Il a été proposé que ces liaisons de basse affinité soient nécessaires au recrutement de diverses protéines lors de la formation des corps de réplication nucléaires des parvovirus (« autonomous-parvovirus associated replication bodies », APARs) générés au cours de l'infection (Bashir, Rommelaere, et Cziepluch, 2001; Cotmore, Gottlieb, et Tattersall, 2007; Cziepluch et al., 2000).

L'une des activités essentielles de la NS1 est le clivage d'un brin du génome viral au niveau de chacun des palindromes terminaux, ce qui permet l'amorçage de la réplication par les polymérases cellulaires (Rhode, 1989). L'interaction de la protéine virale avec divers facteurs cellulaires est toutefois requise pour l'activité de l'endonucléase. Le clivage à l'extrémité gauche requiert la liaison de la protéine Parvovirus Initiation Factor (PIF ou « glucocorticoid modulating element »), un complexe hétérodimérique de protéines de la famille KDWK, impliquées dans la régulation de la transcription de plusieurs familles de gènes (Burnett, Christensen, et Tattersall, 2001; Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1997a; Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1997b; Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1999). À l'extrémité droite du génome, la NS1 nécessite la présence de la « High mobility group 1/2 » (HMG1/2), des protéines qui se lient à l'ADN portant des structures secondaires complexes (Cotmore, Christensen, et Tattersall, 2000; Cotmore et Tattersall, 1998; Rusznak, Candido, et Astell, 1988). L'activation de l'endonucléase virale entraîne le clivage d'un seul brin de l'ADN, libérant une extrémité 3'-OH nécessaire à la polymérase cellulaire tandis que la NS1 devient liée de façon covalente à l'extrémité 5'-P de l'ADN clivé (Cotmore et Tattersall, 1988; Faust, Brudzynska, et Morgan, 1989) par sa tyrosine en position 210 (Y210, Figure 7) (Nuesch, Cotmore, et Tattersall, 1995). L'analyse des résidus conservés de la NS1 a

démontré que les tyrosines en position 188 et 192 sont aussi importantes pour la liaison à l'ADN (Skiadopoulos et Faust, 1993) et que l'histidine 129 permet la liaison avec les ions métalliques. Le lien covalent permet la co-précipitation de l'ADN viral avec des anticorps dirigés contre NS1 (Cotmore et Tattersall, 1988) et la protéine peut aussi être co-purifiée avec les virions néoformés, la NS1 étant reliée au virus par 24 nucléotides du génome se trouvant à l'extérieur des capsides pleines (Cotmore et Tattersall, 1989).

En plus de ses rôles au niveau de la réplication et de la transcription du génome, la protéine NS1 est responsable de la grande majorité des effets cytopathiques des parvovirus, bien que la NS2 peut agir en synergie avec celle-ci (Brandenburger et al., 1990; Caillet-Fauquet et al., 1990; Legrand, Rommelaere, et Caillet-Fauquet, 1993). Un des mécanismes proposés pour la cytotoxicité de la NS1 est la trans-activation (Vanacker *et al.*, 1996; Vanacker *et al.*, 1993) et/ou la *trans*-inhibition de divers promoteurs cellulaires (Faisst et al., 1993; Legendre et Rommelaere, 1992). En effet, les mutations de la protéine NS1 qui abolissent ses fonctions de trans-activation réduisent aussi sa cytotoxicité (Li et Rhode, 1990; Vanacker et Rommelaere, 1995).

Par ailleurs, il a été démontré que la transformation cellulaire peut augmenter la susceptibilité des cellules à l'infection et à la lyse par les parvovirus, plusieurs d'entre-eux étant reconnus pour être oncotropiques (Chen et al., 1986; Chen et al., 1989; Cornelis et al., 1988a; Dupressoir et al., 1989; Legrand et al., 1992; Mousset et Rommelaere, 1988; Van Hille et al., 1989). L'augmentation de la susceptibilité des cellules corrèle souvent avec l'augmentation de l'expression de NS1 et de la réplication virale (Cornelis *et al.*, 1990; Guetta *et al.*, 1990; Spegelaere *et al.*, 1991; Van Hille *et al.*, 1989) bien que la transformation cellulaire elle-même n'est pas suffisante pour permettre ces effets (Mousset *et al.*, 1994; Salome *et al.*, 1990). Ainsi, l'augmentation de la transcription à partir du promoteur P4 est plutôt due à l'activation de divers oncogènes (Perros *et al.*, 1995; Vanacker *et al.*, 1996) et/ou à la réduction de l'expression de plusieurs suppresseurs de tumeurs (Lopez-Guerrero *et al.*, 1997; Rayet *et al.*, 1998). Les effets cytotoxiques de la NS1 peuvent aussi résulter de clivages de la chromatine induits par la protéine virale (Op De Beeck et Caillet-Fauquet, 1997a) et par la modification des patrons de phosphorylation de diverses protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Anouja et al., 1997; Op De Beeck et Caillet-Fauquet, 1997b). En ce sens, il a été démontré que l'infection par le parvovirus MVM provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase S (Oleksiewicz et Alexandersen, 1997; Op De Beeck et Caillet-Fauquet, 1997b) et en phase G2 (Op De Beeck

*et al.*, 1995) en entraînant l'accumulation des protéines p53 et p21<sup>cip1</sup> (Op De Beeck *et al.*, 2001), qui régulent plusieurs kinases du cycle cellulaire dont le complexe Cycline A et la « cyclin dépendant kinase 2 » (Cdk2).

Les diverses activités de la protéine NS1 sont régulées par son état de phosphorylation *in vitro* (Nuesch *et al.*, 1998a; Nuesch *et al.*, 1998b) et *in vivo* (Corbau *et al.*, 1999). En effet, la phosphorylation de la thréonine en position 403 par les protéines kinases C (PKC) régule sa capacité de trans-activation du promoteur P38 (Corbau *et al.*, 2000), tandis que la modification spécifique des résidus T435 et S473 par l'isoforme lambda de PKC (PKC $\lambda$ ) est nécessaire à l'activation de l'hélicase virale (Dettwiler, Rommelaere, et Nuesch, 1999; Nuesch, Christensen, et Rommelaere, 2001). La phosphorylation supplémentaire par l'isoforme  $\eta$  de PKC (PKC $\eta$ ) est toutefois nécessaire pour l'activation complète de NS1 lors de la réplication virale (Lachmann, Rommeleare, et Nuesch, 2003). De plus, il a été démontré que deux acides aminés de la portion C-terminale de NS1, T585 et S588, sont phosphorylés tardivement au cours de l'infection, ce qui contribue à la régulation des effets cytopathiques de la protéine. En effet, la substitution T585A diminue la toxicité de la NS1 lors de l'infection alors que la mutation S588A l'augmente, suggérant que la régulation des modifications post-traductionnelles de la protéine par les PKC module l'intensité des signaux menant à la lyse des cellules (Daeffler *et al.*, 2003).

Étonnamment, l'infection par le MVM entraîne aussi une altération des profils de phosphorylation et de la distribution intracellulaire de deux protéines de la cascade des PKC, soit phosphoinositide-dépendant-kinase 1 (PDK-1) et PKC $\eta$  suggérant que la phosphorylation de NS1 est partiellement autorégulée (Lachmann *et al.*, 2008). D'une part, l'infection par le MVM altère la distribution intracellulaire de PDK-1, et cette protéine interagit avec PKC $\lambda$  pour partiellement activer PKC $\eta$  (Lachmann *et al.*, 2008). D'autre part, la phosphorylation de NS1 par PKC $\lambda$  permet l'interaction de la protéine virale avec la Caséine Kinase II alpha (CKII $\alpha$ ) (Nuesch et Rommelaere, 2006). Ce complexe active la radixine, de la famille Ezrine-Radixine-Moesine, qui peut à son tour activer PKC $\eta$  pour phosphoryler NS1 à nouveau (Figure 8) (Nuesch *et al.*, 2009).

L'interaction de la NS1 avec la CKII $\alpha$  modifie aussi l'activité et la spécificité de substrat de la kinase et entraîne la modification de la tropomyosine (Nuesch et Rommelaere, 2007) et de la gelsoline (Bar *et al.*, 2008) lors des étapes tardives de l'infection. Ces modifications facilitent l'exocytose des virions en permettant un remodelage

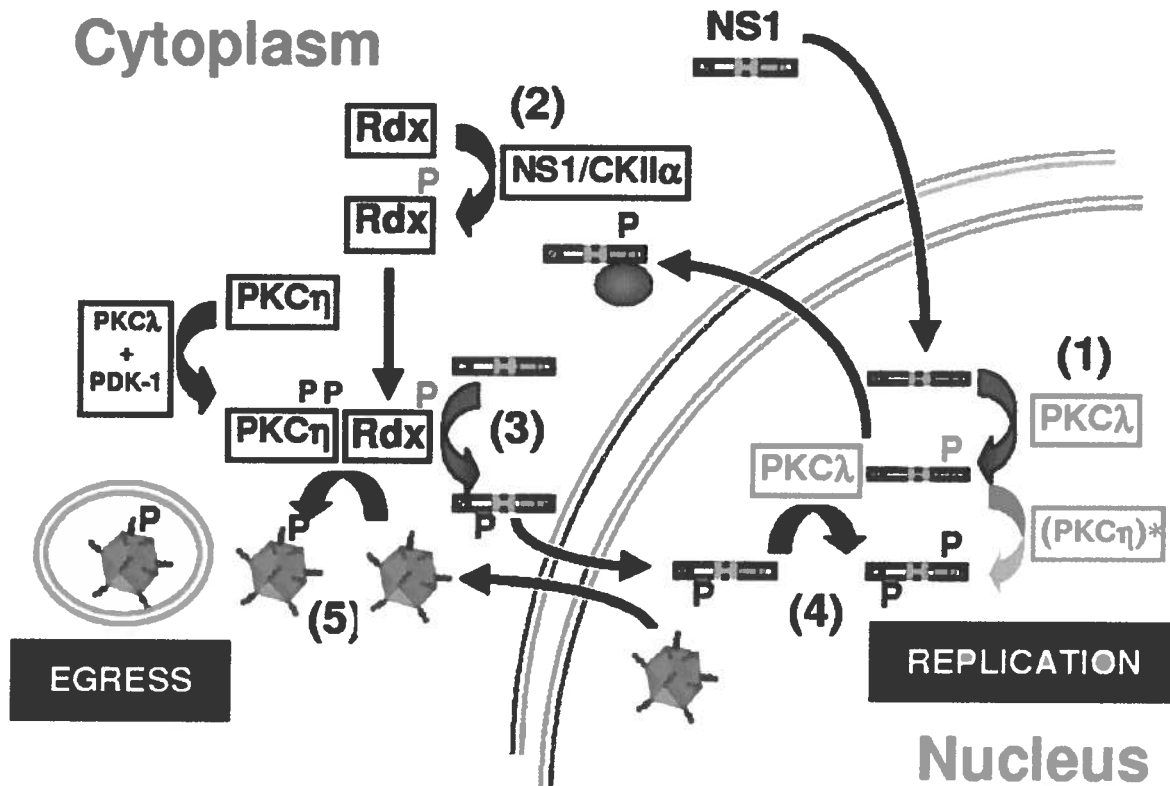


des structures de la cellule, caractéristiques des effets cytopathiques du virus (Nuesch, Lachmann, et Rommelaere, 2005). Finalement, il a été suggéré que l'activation de PKC $\eta$  (via NS1-CKII $\alpha$  et la radixine) pourrait permettre la phosphorylation de l'extrémité N-terminale de la protéine VP2 (Nuesch *et al.*, 2009), essentielle à l'exocytose de virions au cours de l'infection (Maroto *et al.*, 2004). En somme, la dissection d'au moins une partie des diverses activités de la protéine NS1 des parvovirus démontre à quel point la capacité codante limitée de ces virus a favorisé l'optimisation de domaines fonctionnels hautement régulés au sein d'une seule et même protéine.

## 4.2 La protéine NS2

La petite protéine non-structurale NS2 est issue de la traduction de l'ARNm R2, un transcrite généré par le promoteur P4 épissé au niveau du grand et du petit intron. Chez le PPV, les premiers 86 acides aminés de NS2 sont partagés avec la NS1 (nucléotides 292 à 547) (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). L'épissage du grand intron joint le premier exon au nucléotide 2020, où la séquence code pour les 75 acides aminés uniques à NS2 de la partie C-terminale de la protéine. Le codon de terminaison de la protéine se situe au nucléotide 2247, en amont du premier site donneur pour l'épissage du petit intron (nucléotide 2280). La masse moléculaire prédite du seul isoforme de la protéine est de 18,1kDa, mais comme cette protéine peut être modifiée par phosphorylation, sa masse apparente est sans doute plus élevée (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Cotmore et Tattersall, 1990). La région commune de NS1 et NS2 du PPV démontre une forte similarité avec celles des autres membres du genre parvovirus (58% d'identité au MVMp, 51% au CPV et 60% au KRP), tandis que la région unique de NS2 est plus divergente (24%, 14% et 5% d'identité avec MVMp, CPV et KRV, respectivement) (Figure 9). Ainsi, bien qu'aucune étude n'ait été faite spécifiquement sur la protéine NS2 du PPV, ses fonctions présumées au cours de l'infection sont tirées d'études faites sur le MVM.

Chez le MVM, la protéine NS2 est produite rapidement au début de l'infection, les ARNm R2 résultant de l'épissage supplémentaire des transcrits R1 (Cotmore et Tattersall, 1990). Toutefois, contrairement à la NS1, la NS2 a une courte demi-vie d'environ 90 minutes et sa dégradation est entraînée par le protéasome par un mécanisme indépendant de l'ubiquitination (Miller et Pintel, 2001). La NS2 est une protéine majoritairement

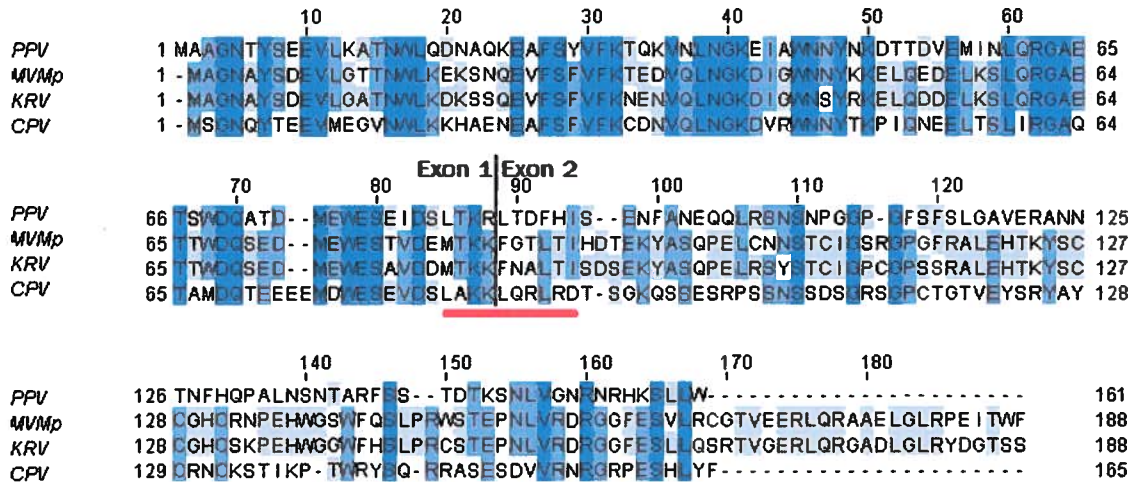


**Figure 8. Modèle proposé de l'interaction entre la NS1 et la CKII $\alpha$  et les PKC.** (1). La NS1 est ciblée au noyau puis activée pour la réplication par PKC $\lambda$  et PKC $\eta$ . (2) La phosphorylation de NS1 permet son interaction avec CKII $\alpha$  qui peut ensuite activer la Radixine. (3). Cette dernière interagit avec PKC $\eta$  (elle-même activée par l'interaction PKC $\lambda$  et PDK-1(4), suite à l'interaction de la NS1 avec celle-ci) pour phosphoryler la région N-terminale de la VP2 externalisée dans les capsides pleines lors de l'exocytose des virions (5). Voir le texte pour plus de détails. Tiré de (Nuesch *et al.*, 2009).

cytoplasmique, bien que sa forme non-phosphorylée puisse être observée au noyau des cellules infectées (Cotmore et Tattersall, 1990). Ainsi, la NS2 interagit avec la protéine survival motor neuron (Smn) au niveau de structures nucléaires APARs induites tardivement dans l'infection, soit les Smn-APAR bodies ou SAABs (Young *et al.*, 2002a; Young *et al.*, 2002b). La formation des SAABs est toutefois indépendante de la présence de NS2 et la conséquence de l'interaction de la protéine virale avec Smn est inconnue (Young *et al.*, 2005).

Tel que mentionné ci-haut, la NS2 contribue au développement d'effets cytopathiques lors de l'infection *in vitro* (Legrand, Rommelaere, et Caillet-Fauquet, 1993; Li et Rhode, 1991) et dans la pathogenèse du virus *in vivo* (Brownstein *et al.*, 1992; Li et Rhode, 1991). Ces effets résultent possiblement de l'interaction de la NS2 avec les protéines de la famille 14-3-3, ces dernières étant impliquées dans la signalisation et dans la régulation du cycle cellulaire (Brockhaus *et al.*, 1996). La protéine NS2 est aussi impliquée dans les étapes d'assemblage des capsides; lorsque la protéine est tronquée au niveau de sa région unique, une quantité normale de protéines VP sont synthétisées et transportées au noyau lors de l'infection, mais les capsides ne sont pas formées (Cotmore *et al.*, 1997). Cependant, aucune interaction directe de la NS2 avec les capsides virales n'a été démontrée.

De nombreuses autres fonctions ont été attribuées à NS2, notamment la régulation de la traduction des ARNm viraux (Naeger, Salome, et Pintel, 1993) via une interaction avec les séquences en 3' non traduites de ces ARNm (Li et Rhode, 1993), l'accumulation de formes répliquatives du génome (Cotmore *et al.*, 1997; Naeger, Cater, et Pintel, 1990) et la productivité de l'infection (Cater et Pintel, 1992). Ces effets dépendent de l'origine de la cellule hôte et les mécanismes qui régissent ces activités demeurent inconnus. Il a toutefois été démontré que l'allotropisme de deux souches de MVM, soit la souche fibroblastique MVMp et la souche lymphotropique MVMi, était en partie la conséquence de l'efficacité de l'épissage du grand intron dans les divers types cellulaires (Colomar, Hirt, et Beard, 1998; Gardiner et Tattersall, 1988b). En effet, l'excision de l'intron est accrue dans les fibroblastes infectés par la souche MVMp par rapport à la souche MVMi; ceci se traduit en une production accrue de NS2 et en une augmentation de la quantité de génomes simple-brin disponibles pour l'encapsidation à la fin de l'infection (Choi *et al.*, 2005).



**Figure 9. Alignement des séquences de la NS2 de plusieurs parvovirus.** Les séquences de la NS2 de divers membres du genre *Parvovirus* (PPV GenBank AAV92674.1, NS2-P MVMp AAB03396.1, CPV AAV54181.1 et KRV AAB38325.1) ont été alignées à l'aide du programme ClustalW2 de EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Les résidus sont colorés en fonction du degré de conservation. La jonction entre les exons 1 et 2 est indiquée par une ligne verticale et le domaine de liaison à la protéine Crm1 est souligné en rouge. Modifié de (Wang *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'étude de la contribution des divers isoformes de NS2 à l'infection par le MVM a indiqué que la synthèse de l'isoforme dominant de la protéine (NS2P) était nécessaire et suffisante pour la réplication du virus dans les cellules murines (Ruiz, D'Abramo, et Tattersall, 2006). Il convient toutefois de noter que les rôles de la protéine NS2 chez le CPV semblent diverger de ceux chez le MVM, puisque l'insertion d'un codon de terminaison au niveau de la partie unique de NS2 ne réduisait que légèrement la productivité de l'infection dans des cellules canines ou félines (Wang *et al.*, 1998).

Enfin, l'une des interactions des mieux caractérisées de la NS2 est celle avec la protéine Crm1 de la famille des karyophérines  $\beta$ . Cette dernière est impliquée dans l'export nucléaire de protéines portant des séquences riches en résidus leucine qui agissent à titre de signal d'export nucléaire ou NES (Bodendorf *et al.*, 1999; Ohshima *et al.*, 1999). Crm1 se lie à la séquence (MxxxFxxLxI) dans le domaine C-terminal de la NS2 (acides aminés 82-91 chez le MVM) (Figure 9) (Eichwald *et al.*, 2002; Ohshima *et al.*, 1999) et exporte préférentiellement les formes non-phosphorylées de la protéine (Bodendorf *et al.*, 1999). De plus, l'inactivation du NES par substitution d'un ou plusieurs des acides aminés hydrophobes entraîne la séquestration nucléaire de NS2 et des capsides virales aux étapes tardives de l'infection ainsi qu'une réduction dans le nombre de virus infectieux produits (Eichwald *et al.*, 2002; Miller et Pintel, 2002).

Étonnamment, une étude de l'infection par le MVM chez des souris immunosupprimées a permis d'isoler des virus ayant un phénotype plus virulent que la souche sauvage. Le séquençage des génomes a révélé que plusieurs mutations niveau du NES de NS2 avaient été sélectionnées qui augmentaient l'affinité de liaison de la protéine virale avec Crm1 (Lopez-Bueno *et al.*, 2004). *In vitro*, ces virus mutants entraînent une séquestration de la karyophérine à la région périnucléaire des cellules infectées. Il a été suggéré que la réduction du transport nucléaire des protéines cellulaires, entraînée par la séquestration de la Crm1, contribue à la réduction de l'activation d'une réponse antivirale au niveau de la cellule et de l'organisme, ce qui augmenterait la virulence des virus mutants. Toutefois, puisque l'activité de Crm1 est aussi essentielle à l'export des virions néo-synthétisés dans la cellule (Maroto *et al.*, 2004), il était difficile de concilier ces différentes observations dans un contexte infectieux. Finalement, il a récemment été démontré que le NES de la NS2 du MVM agit à titre de signal d'export « supra-physiologique » (SupraNES), permettant une liaison de très forte affinité entre la protéine virale et la Crm1, et ce même en l'absence de l'interaction avec RanGTP (Engelsma *et al.*, 2008). Cette dernière est une

protéine impliquée dans le transport nucléaire qui permet l'interaction entre la plupart des NES classiques et la Crm1. L'hydrolyse de RanGTP en RanGDP au niveau du cytoplasme permet la dissociation de Crm1 et de la protéine portant le NES (Pemberton et Paschal, 2005). Le SupraNES de NS2 permettrait l'export des virions matures (contenant le génome) via Crm1, tandis que les mutations dans le domaine de liaison à Crm1 de NS2 entraîneraient la séquestration de NS2 au noyau par les capsides (Engelsma *et al.*, 2008). Pour sa part, la séquestration de Crm1 au cytoplasme serait la conséquence de l'expression élevée de NS2 et de sa forte affinité pour la karyophérine plutôt que d'une inhibition du transport en tant que tel. Enfin, aucune interaction directe n'a été démontrée entre la NS2 et la capside ou les protéines structurales, indiquant que d'autres composantes cellulaires ou virales sont impliquées dans l'interaction de ces protéines lors des étapes tardives du cycle infectieux (Eichwald *et al.*, 2002; Engelsma *et al.*, 2008; Lopez-Bueno *et al.*, 2004; Miller et Pintel, 2002).

### 4.3 La protéine VP1

La protéine minoritaire de la capside est traduite à partir de l'ARNm R4 (2,9kb) issue de promoteur tardif et épissé à partir du deuxième donneur de petit intron (nucléotides 2313-2386) (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). Puisqu'elles sont traduites dans le même cadre de lecture, les protéines structurales ne diffèrent que par la présence d'une extension N-terminale de la protéine VP1 (Labieniec-Pintel et Pintel, 1986). Chez le PPV, la protéine a une masse apparente de 84kDa (Molitor, Joo, et Collett, 1983) et 150 de ses 729 acides aminés sont uniques à la protéine, cette région étant nommée VP1up (VP1 unique part). Les premiers essais de production de capsides à l'aide de systèmes d'expression de VP2 ont permis de déterminer que la VP1 n'était pas nécessaire à l'auto-assemblage des capsides (Lopez de Turiso *et al.*, 1992; Martinez *et al.*, 1992; Saliki *et al.*, 1992). Toutefois, les capsides formées en cours d'infection par un virus qui ne produit pas la VP1 ne peuvent initier l'infection, bien qu'elles encapsident le génome et se lient à la surface cellulaire aussi efficacement que le virus sauvage (Tullis, Burger, et Pintel, 1993). De plus, VP1up se trouve à l'intérieur de la capside dans les virions relâchés à la suite de l'infection et l'externalisation est induite par les changements de conformation de la capside lors du transport des virions dans l'environnement acide de la voie endosomale (Mani *et al.*, 2006). L'externalisation de la VP1up par les pores de la capside aux axes de symétrie 5 peut aussi être reproduite *in*

*in vitro* par traitement thermique (Cotmore *et al.*, 1999) et est grandement facilitée par le clivage préalable de la VP2 en VP3 (Farr, Cotmore, et Tattersall, 2006).

L'analyse de VP1up a démontré l'existence d'une phospholipase virale de type A<sub>2</sub> (vPLA<sub>2</sub>), qui comporte de nombreuses caractéristiques semblables aux PLA<sub>2</sub> sécrétés (sPLA<sub>2</sub>) (Zadori *et al.*, 2001). Ce domaine enzymatique hautement conservé au sein de la famille des *Parvoviridae* porte le motif consensus de la boucle de liaison au Ca<sup>2+</sup> (motif YXGXY) et du site catalytique (motif HDXXY) des sPLA<sub>2</sub>. La substitution des acides aminés de ces motifs abolie l'activité enzymatique et l'infectivité du virion (Zadori *et al.*, 2001). Par ailleurs, les vPLA<sub>2</sub> démontrent une spécificité de substrat semblable aux sPLA<sub>2</sub>, malgré que leurs structures soient très différentes (Canaan *et al.*, 2004) et que les vPLA<sub>2</sub> soient insensibles à l'action de la plupart des inhibiteurs des sPLA<sub>2</sub> (Zadori *et al.*, 2001). L'activité lipolytique de la vPLA<sub>2</sub> du PPV est très forte, de l'ordre des PLA<sub>2</sub> des plus actives, elle varie toutefois considérablement entre les différents parvovirus (Canaan *et al.*, 2004). Il a été démontré que l'activité phospholipase est inutile à l'attachement ou à l'internalisation des virions (Canaan *et al.*, 2004; Zadori *et al.*, 2001) L'externalisation de la VP1up est absolument requise pour l'évasion des virions des vésicules de la voie endosomale au cours des étapes précoces de l'infection (Farr, Zhang, et Tattersall, 2005; Suikkanen *et al.*, 2003b).

Par ailleurs, la VP1up porte plusieurs séquences riches en acides aminés basiques qui agissent à titre de NLS, mais la contribution de chacune au transport nucléaire diffère chez les membres des *Parvovirus* (Lombardo *et al.*, 2002; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). Chez le MVM, la protéine VP1up porte quatre groupes de résidus basiques (BC1-BC4), et la présence unique de BC1 permet le transport au noyau de la VP1 (Lombardo *et al.*, 2002). La présence des quatre BC est toutefois nécessaire à l'établissement de l'infection, sans doute pour le ciblage au noyau de la capsidite suite aux étapes d'entrée du virus (Lombardo *et al.*, 2002). Chez le CPV, la VP1up porte aussi plusieurs séquences basiques et le NLS (4-PAKRARRGYK-13) correspondant à BC1 du MVM peut permettre la localisation nucléaire d'une protéine hétérologue (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Cette séquence est aussi importante pour le transport au noyau des capsides lors de l'entrée du virus, mais n'est pas nécessaire à la production des virions (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). Le PPV possède aussi le NLS classique trouvé chez le CPV et le MVM, ainsi qu'une série de séquences basiques au niveau de sa partie N-terminale (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). Les études récentes de mutagenèse suggèrent que ces résidus seraient importants pour le transport nucléaire de

VP1up mais pourraient aussi servir de signal de localisation nucléolaire chez le PPV (V. Bouchard-Lévesque, M. Boisvert, S. Fernandes et P. Tijssen, données non publiées). Une analyse plus approfondie sera toutefois nécessaire pour déterminer quel(s) rôle(s) ont ces séquences pour la suite de l'infection.

Enfin, comme pour les protéines non-structurales, les protéines de la capsidie sont modifiées par phosphorylation suivant leur synthèse. L'analyse des divers phosphopeptides a permis de conclure que les protéines VP1 et VP2 ne subissent pas exactement le même patron de phosphorylation (Valle, Riolobos, et Almendral, 2006; Vihinen-Ranta et al., 2002). Toutefois, la conséquence des modifications post-traductionnelles spécifiques de la protéine VP1 au cours du cycle infectieux demeure inconnue.

#### 4.4 La protéine VP2

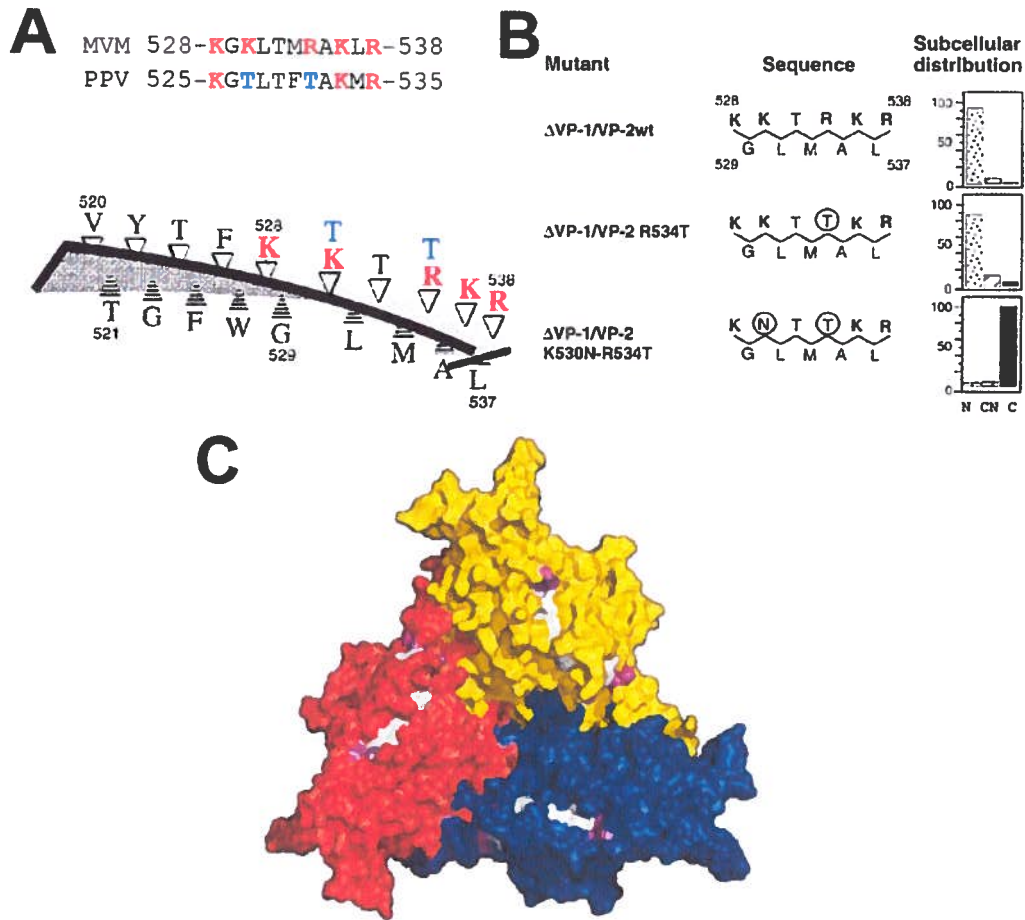
La protéine VP2 est la composante majoritaire de la capsidie chez les *Parvovirus*. Chez le PPV, elle est encodée par le transcrit R4 (2,9kb) épissé au niveau du petit intron à l'aide du premier site donneur (nucléotides 2287-2386) (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). La protéine de 579 acides aminés a une masse apparente de 64kDa (Molitor, Joo, et Collett, 1983) et elle est clivée lors des étapes précoces de l'infection pour générer la protéine VP3 (60kDa), où une vingtaine d'acides aminés de la région N-terminale sont susceptibles au clivage par diverses protéases (Paradiso, Williams, et Costantino, 1984; Weichert et al., 1998). Tel que mentionné ci-haut, la présence de VP2 est suffisante pour permettre l'assemblage des capsides, mais celles-ci nécessitent la présence de VP1 pour initier l'infection. Par ailleurs, afin de permettre le transport nucléaire de la protéine qui ne possède pas les résidus basiques contenus au niveau de VP1up, il a été déterminé que VP2 porte plutôt un motif de localisation nucléaire (NLM) (Lombardo *et al.*, 2000). Ainsi, une séquence linéaire riche en acides aminés basiques forme l'un des brins  $\beta$  à la surface interne des sous-unités trimériques de la capsidie. Ce motif est suffisant pour l'import nucléaire des trimères formés par les VP2 seules (Lombardo *et al.*, 2000). Bien que les trimères portant au moins une VP1 (munie de ses NLS) devraient être compétents pour le transport nucléaire, la présence du NLM est requise pour permettre l'import nucléaire de trimères formés uniquement de VP2, sans quoi la capsidie ne peut s'assembler due à la formation d'agrégats (Riolobos *et al.*, 2006). La comparaison des séquences formant le



NLM du MVM avec la séquence analogue chez le PPV ne démontre toutefois qu'une faible similarité au niveau des résidus basiques (Figure 10A, C). D'ailleurs, chez le MVM, l'échange de ces résidus basiques non-conservés entraîne une localisation cytoplasmique des trimères (Figure 10B) (Lombardo *et al.*, 2000). Ces observations suggèrent donc qu'au moins chez le PPV, d'autres motifs ou mécanismes permettant la localisation nucléaire des sous-unités d'assemblage de la capsid seraient nécessaires (S. Fernandes et P. Tijssen, observations non publiés).

La plupart des études sur les modifications post-traductionnelles des protéines structurales sont centrées sur l'analyse des profils de phosphorylation de la VP2 du MVM. Ainsi, il a été démontré que la partie N-terminale de VP2 (2Nt) contient la majorité des modifications de phosphorylation, notamment au niveau des résidus sérines aux positions 2, 6 et 10 (Maroto, Ramirez, et Almendral, 2000). Seule la sérine en position 2 est conservée chez le PPV et le CPV. Cette région de VP2 est clivée en VP3 lors de l'entrée des virions, de sorte que ces événements de phosphorylation ne sont pas nécessaires à l'établissement de l'infection (Santaren, Ramirez, et Almendral, 1993). De plus, l'externalisation de la 2Nt est impliquée dans l'exocytose des virions nouvellement formés (Maroto *et al.*, 2004), processus qui nécessite Crm1 et le « SupraNES » de NS2 (Engelsma *et al.*, 2008). Tel que mentionné précédemment, il a récemment été proposé que la phosphorylation de 2Nt est effectuée par PKC $\eta$  dans une cascade de phosphorylation activée par l'interaction entre la NS1 et la CKIIa (Figure 8) (Nuesch *et al.*, 2009).

Enfin, une étude récente a démontré que la phosphorylation des sous-unités de la capsid par la protéine Raf-1 était nécessaire au transport nucléaire (Riolobos *et al.*, 2010). En effet, lorsque les protéines structurales sont produites via le système d'expression du baculovirus, les capsides sont assemblées dans le cytoplasme des cellules d'insectes. Les travaux de Riolobos *et al.* ont démontré que les sous-unités de la capsid produites par le système d'expression hétérologue étaient hypo-phosphorylées et que la co-expression de la protéine Raf-1 permettait de reproduire le profil de phosphorylation natif des protéines VP2. Ces sous-unités phosphorylées et purifiées étaient compétentes pour le transport nucléaire avant l'assemblage (Riolobos *et al.*, 2010). Puisque la protéine Raf-1 est un proto-oncogène et fait partie de la voie des MAPK, qui inclut aussi le proto-oncogène Ras, il a été suggéré que la modification post-traductionnelle des protéines VP soit l'une des voies impliquées dans l'oncotropisme de plusieurs parvovirus. Ainsi, le degré d'activation des protéines Raf-1



**Figure 10. Comparaison du NLM des protéines VP2 entre le PPV et le MVM. A.** La séquence du NLM entre le MVM et le PPV diffère par rapport à la présence de résidus basiques (en rouge). Les substitutions des résidus basiques trouvées chez le PPV sont indiquées en bleu. **B** . La mutation de ces résidus chez le MVM entraîne une localisation cytoplasmique des protéines VP. Tiré de (Lombardo *et al.*, 2000). **C.** Position du NLM à la surface interne du trimère des protéines VP du PPV. Chacune des protéines est d'une couleur différente (jaune, rouge et bleu). Le NLM est en blanc et les résidus basiques conservés chez le PPV sont en mauve. Modèle généré avec PyMol (PDB 1K3V).

et Ras peuvent influencer sur les profils de phosphorylation des protéines VPs afin de contribuer à l'efficacité de l'infection dans certaines cellules transformées (Riolobos et al., 2010).

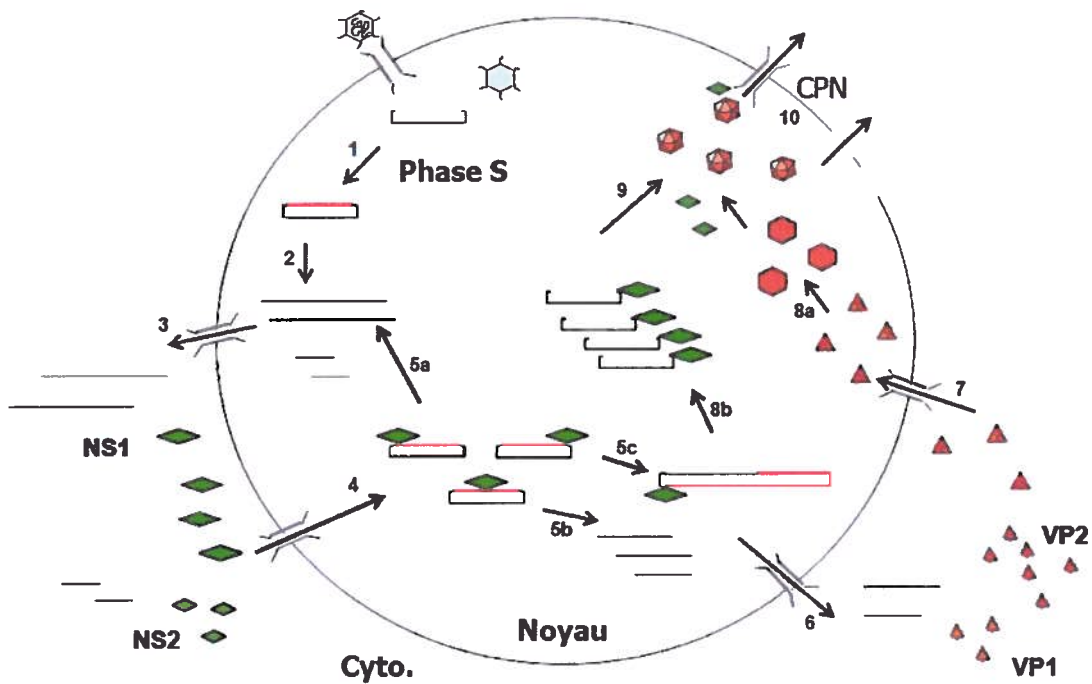
## 4.5 La protéine SAT

La petite protéine « small alternatively translated protein » (SAT) est traduite à partir de l'ARNm des protéines structurales épissé selon le profil de VP2 (profil A, Figure 4A en haut). La protéine compte 68 acides aminés chez le PPV et aurait une masse calculée de 7.4kDa. Cette protéine est présente chez les membres du genre *Parvovirus*, *Amdovirus* (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005), et chez les virus apparentés au PARV4 (Simmonds et al., 2008; Szelei et al., 2010). La séquence primaire de cette protéine non-structurale n'est pas conservée mais les prédictions de sa structure secondaire indiquent que la SAT formerait des hélices  $\alpha$  transmembranaires. Chez le PPV, les virions SAT<sup>-</sup> (portant une substitution au niveau de l'AUG de la protéine) sont diminués dans leur potentiel de réplication comparativement au virus sauvage (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005). Enfin, des protéines de fusion de la SAT ont été colocalisées avec la calréticuline au réticulum endoplasmique, suggérant fortement que la protéine serait ciblée à la membrane de cette organelle. L'impossibilité de générer des lignées cellulaires exprimant la protéine par transfection stable suggère que la SAT est toxique pour les cellules de mammifères et qu'elle pourrait contribuer aux effets cytotoxiques de l'infection virale en induisant un stress cellulaire au réticulum endoplasmique (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005). Cette hypothèse devra toutefois être confirmée avant que l'on puisse comprendre l'étendue des effets de la protéine SAT pour le cycle infectieux.

## 5. Le cycle de réplication viral

À priori, le cycle de réplication des parvovirus est fort simple comparativement à celui des plus gros virus (Figure 11). Au cours des étapes précoces, les virions se lient à la surface cellulaire et sont transportés par la voie endosomale (Basak et Turner, 1992)

jusqu'à leur site de réplication au noyau (Binn *et al.*, 1970). Puis, le génome simple-brin (Tattersall, Crawford, et Shatkin, 1973) est converti en une matrice de transcription double-brin (Bourguignon, Tattersall, et Ward, 1976) afin de permettre l'expression des protéines précoces NS1 et NS2 (Clemens et Pintel, 1988), issues de l'épissage alternatif du même ARNm (Cotmore, Sturzenbecker, et Tattersall, 1983). Puis, la protéine multifonctionnelle NS1 est ciblée au noyau (Rhode et Paradiso, 1989) afin d'activer la réplication du génome (Rhode, 1989), de réguler la transcription à partir de son propre promoteur (Hanson et Rhode, 1991) et de trans-activer le promoteur tardif pour la synthèse des protéines structurales, les VP (Rhode, 1985). Ces dernières, également générées par épissage alternatif (Jongeneel *et al.*, 1986), sont traduites au cytoplasme et s'assemblent en trimères avant leur transport au noyau (Riolobos *et al.*, 2006). Quant à lui, le génome est répliqué à l'aide de la NS1 et des protéines cellulaires selon un mécanisme similaire à celui du cercle-roulant (Tattersall et Ward, 1976). Puis, lors des étapes tardives du cycle, les nouvelles copies du génome sont excisées à partir des concatémères du génome (Rhode, 1989) et les protéines structurales s'assemblent en capsides vides au niveau du noyau (Clemens *et al.*, 1992). La protéine NS1 dirige ensuite l'insertion du génome à l'intérieur des capsides préformées (Cotmore et Tattersall, 2005b) et la NS2 facilite l'export nucléaire d'une partie des nouveaux virions (Eichwald *et al.*, 2002). Pendant ce temps, l'interaction de NS1 et de NS2 (Legrand, Rommelaere, et Caillet-Fauquet, 1993) et de la SAT (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005) avec diverses protéines cellulaires conduit finalement à la lyse de la cellule, suite à laquelle les virions se trouvent dans le milieu extracellulaire (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990), prêts à infecter de nouvelles cellules. Bien que cette courte description récapitule les principales étapes du cycle infectieux des membres du genre *Parvovirus*, elle n'est qu'une vision très simpliste d'un processus hautement régulé, qui permet à un virus portant seulement deux gènes d'usurper la machinerie cellulaire à ses propres fins. En effet, l'analyse détaillée de chacune des étapes ne cesse de révéler des subtilités essentielles à la réplication de cette famille de virus plutôt méconnue.

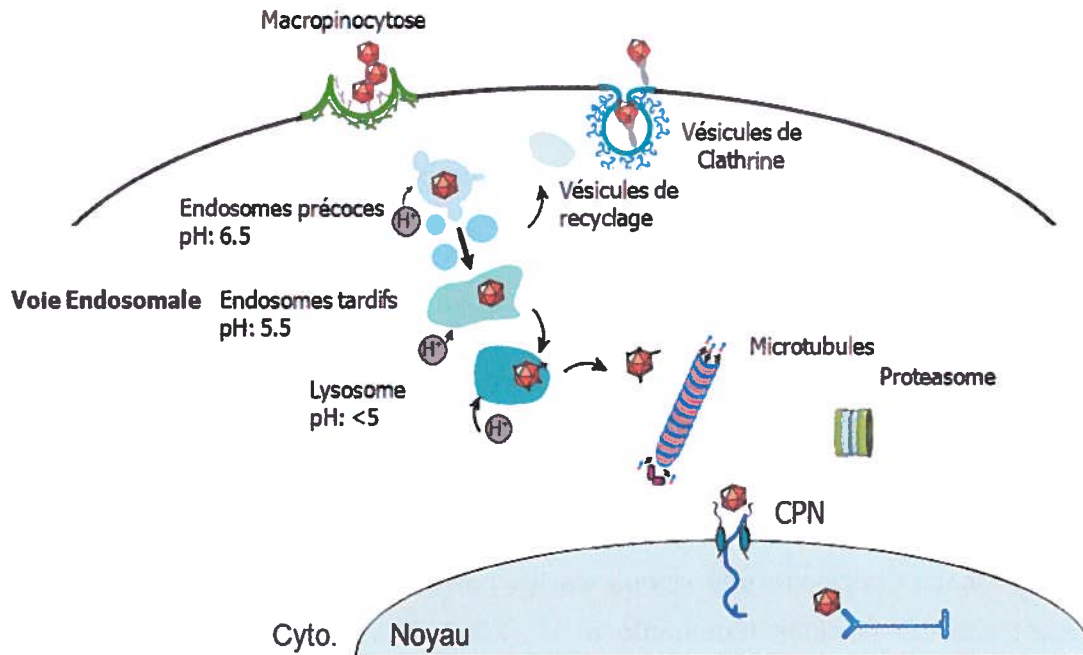


**Figure 11. Cycle de réplication du PPV.** Les étapes précoces du cycle de réplication permettent au génome viral d'être livré au noyau (non illustré, voir Figure 13). La phase S du cycle cellulaire permet de générer la matrice de transcription double brin (1). Les ARNm sont transcrits à partir du promoteur précoce (2). Les protéines NS sont synthétisées (3). La NS1 est ciblée au noyau (4) pour réguler la transcription à partir de son promoteur (5a), de *trans*-activer le promoteur tardif (5b) et de répliquer le génome viral (5c). Les ARNm tardifs permettent la synthèse des protéines VP (6) et celles-ci s'assemblent en trimères pour le transport au noyau (7). Les trimères s'assemblent en capsides vides (8a) et le génome simple-brin est excisé des concatémères du génome (8b) pour être encapsidés (9). Les virions néoformés sont exportés du noyau et de la cellule à la fin de l'infection (10) et la cellule meurt par nécrose suite aux effets cytopathiques induits par le virus.

## 5.1 Les étapes précoces de l'infection

Les parvovirus ont des cycles de réplication nucléaires. Par conséquent, le but des étapes précoces de l'infection est de livrer le génome au noyau à partir de la surface cellulaire (Figure 12). Bien que plusieurs étapes communes aient été identifiées, les détails des mécanismes demeurent obscurs en plusieurs points. À ce jour, aucun récepteur de la surface cellulaire n'a été identifié pour l'attachement de plusieurs parvovirus, dont le PPV et le MVM, bien que la liaison aux molécules d'acide sialique soit impliquée (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Cotmore et Tattersall, 1987). En effet, le traitement des cellules avec la neuraminidase permet d'inhiber presque totalement l'infection (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Nam et al., 2006). Pour leurs parts, le CPV et le FPV peuvent aussi se lier à ces molécules, bien qu'il ne s'agisse pas du récepteur principal puisque l'activité d'hémagglutination n'est pas essentielle à l'infection (Barbis, Chang, et Parrish, 1992). Le récepteur principal des souches de la panleucopénie féline (*i.e.* le FPV, le CPV, le MEV et le RPV), est le récepteur de la transferrine (TfR) (Parker *et al.*, 2001). Cet attachement est suivi de l'internalisation rapide des virions par endocytose dirigée par le récepteur dans les puits recouverts de clathrine (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Parker et Parrish, 2000; Ros, Burckhardt, et Kempf, 2002). Il a toutefois été démontré qu'au moins chez le PPV, une partie des virions peuvent aussi être internalisés par macropinocytose, un processus qui ne nécessite pas la liaison à un récepteur spécifique (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). Ce processus est utilisé préférentiellement par les agrégats de virions, tandis que les particules virales isolées suivent une voie d'endocytose classique.

Peu importe le mode d'entrée au niveau de la surface cellulaire, les parvovirus sont alors transportés dans des vésicules de la voie endosomale (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Harbison et al., 2009; Mani et al., 2006; Vihinen-Ranta et al., 1998; Vihinen-Ranta, Yuan, et Parrish, 2000). L'acidification des vésicules est ensuite une étape nécessaire mais insuffisante à l'infection (Basak et Turner, 1992; Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Ros, Burckhardt, et Kempf, 2002; Zadori et al., 2001). La diminution du pH et la présence d'autres composantes retrouvées dans les endosomes tardifs et/ou lysosomes permettent l'induction des changements de conformation de la capsidie qui mènent d'abord au clivage de VP2 en VP3, puis à l'externalisation de VP1up portant le motif de vPLA<sub>2</sub> et à



**Figure 12. Étapes précoces de l'infection par le PPV.** Le PPV est internalisé par endocytose dirigée par le récepteur et par macropinocytose. Le transport dans la voie endosomale permet les changements de conformation de la capsidie dont l'externalisation de la VP1up. La vPLA<sub>2</sub> portée par la VP1up permet l'évasion de la voie endosomale. Les microtubules et le protéasome sont impliqués dans le transport du virus jusqu'au noyau. Le génome viral est livré au noyau suite à sa décapsidation au niveau du pore nucléaire ou dans le noyau. Voir le texte pour plus de détail. Schéma par Maude Boisvert.

l'augmentation de l'accessibilité du génome (Cotmore *et al.*, 1999; Lombardo *et al.*, 2002; Mani *et al.*, 2006; Suikkanen *et al.*, 2003b; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002).

Il a été démontré que la leucine en position 172 de VP2 (chez le MVM) est située à la base du pore à l'axe de symétrie 5 de la capsid (Farr et Tattersall, 2004) et que cet acide aminé a un rôle primordial dans l'orchestration de l'externalisation de VP1up (Farr, Cotmore, et Tattersall, 2006). La vPLA<sub>2</sub> permet ensuite l'évasion des vésicules de la voie endosomale (Canaan *et al.*, 2004; Farr, Zhang, et Tattersall, 2005; Suikkanen *et al.*, 2003b), afin de permettre aux virions de se retrouver dans le cytoplasme (Ros, Burckhardt, et Kempf, 2002; Vihinen-Ranta, Yuan, et Parrish, 2000). Ces derniers sont alors transportés à l'aide de la protéine moteur dynéine sur les microtubules (Suikkanen *et al.*, 2003a; Suikkanen *et al.*, 2002), ces filaments étant aussi essentiels au transport des endosomes eux-mêmes (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010).

L'activité chymotrypsine du protéasome est ensuite nécessaire pour l'apprêtement des virions avant leur transport au noyau, bien que ceci n'influence ni le clivage de la VP2 en VP3, ni l'externalisation de la VP1 (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Ros, Burckhardt, et Kempf, 2002; Ros et Kempf, 2004). Enfin, tel que mentionné précédemment, les NLS et les régions basiques portés par la VP1up seraient impliqués dans le ciblage et la translocation nucléaire des virions via les pores nucléaires, bien que ces mécanismes n'aient pas été élucidés (Lombardo *et al.*, 2002; Maroto, Ramirez, et Almendral, 2000; Nicolas *et al.*; Vihinen-Ranta *et al.*, 1997; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002; Vihinen-Ranta, Yuan, et Parrish, 2000). Les changements de conformation de la capsid menant à l'externalisation de la VP1up permettent aussi au génome d'être facilement décapsidé (Farr, Cotmore, et Tattersall, 2006; Mani *et al.*, 2006; Ros *et al.*, 2006) en direction 3'-5' à partir des pores de la capsid (Cotmore, Hafenstein, et Tattersall, 2010). Des études récentes sur la micro-injection d'oocytes de *Xenopus laevis* et de noyaux purifiés de cellules de rat ont toutefois suggéré que le MVM pourrait traverser la barrière nucléaire en induisant des bris au niveau de la double enveloppe lipidique du noyau (Cohen *et al.*, 2006; Cohen et Pante, 2005). L'implication de cette voie de transport nucléaire au cours des étapes précoces du cycle infectieux demeure toutefois incertaine. Les dernières étapes de l'entrée des parvovirus dans la cellule, notamment l'évasion de la voie endosomale ainsi que le ciblage et l'entrée nucléaire, sont reconnues pour être très inefficaces, puisque les virions entrant peuvent être observés en périphérie du noyau à quelques heures post-infection (Boisvert *et*

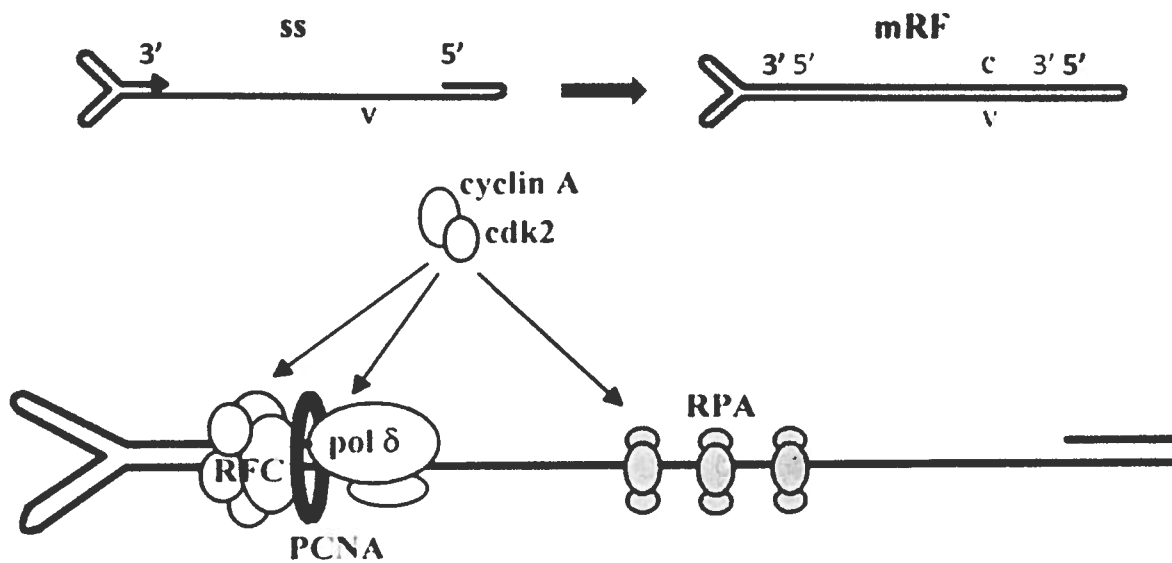


*al.*, 2010; Parker *et al.*, 2000; Suikkanen *et al.*, 2003a; Zadori *et al.*, 2001). Enfin, peu importe la méthode utilisée par les parvovirus pour livrer le virion et/ou le génome viral au noyau, l'entrée en phase S du cycle cellulaire demeure l'étape déterminante pour la suite de l'infection (Cotmore et Tattersall, 1987).

## 5.2 Les étapes intermédiaires de l'infection

### 5.2.1 La réplication du génome : Modèle de « l'épingle-roulante »

La nature du génome simple-brin des parvovirus est un facteur inhérent à la dépendance de ces virus de la phase « S » du cycle cellulaire, laquelle ces virus ne peuvent induire (Pritchard *et al.*, 1978; Tattersall, 1972; Tattersall, Crawford, et Shatkin, 1973). Ainsi, la transcription du génome et la synthèse des protéines virales ne peuvent avoir lieu qu'après la conversion du génome monocaténaire en un intermédiaire double-brin (Siegl et Gautschi, 1976; Tattersall, Crawford, et Shatkin, 1973). Chez les membres du genre Parvovirus, il y a une nette prédominance pour l'encapsidation du génome de polarité négative, c'est-à-dire le brin non-codant (Tattersall, 2006). La conversion du génome est permise par le repliement des palindromes qui servent d'amorces aux polymérases cellulaires (Figure 13) (Bourguignon, Tattersall, et Ward, 1976). La partie centrale du génome est alors copiée à l'aide de l'ADN polymérase  $\delta$  (Pol $\delta$ ) et de ses cofacteurs : « proliferating cell nuclear antigen » (PCNA), « replication factor C » (RFC) et « replication protein A » (RPA) dès l'entrée en phase S (Bashir *et al.*, 2000). Puis, l'extrémité nouvellement synthétisée est liguée par une protéine cellulaire (Cotmore, Gunther, et Tattersall, 1989; Lochelt, Haas, et Kaaden, 1990). Cette conversion du génome en sa forme monomérique répliquative (mRF), permettant la transcription, dépend aussi de la présence de la cycline A et de la Cdk2, deux protéines nécessaires à la transition du cycle cellulaire de la phase G<sub>1</sub> à la phase S (Bashir, Rommelaere, et Cziepluch, 2001). Cette mRF est bicaténaire, fermée aux deux bouts, possède une copie de chacun des palindromes terminaux et a une longueur totale équivalente au génome simple brin, soit de 4-6kb selon l'identité du parvovirus (Baldauf *et al.*, 1997; Cotmore, Gunther, et Tattersall, 1989; Lochelt, Haas, et Kaaden, 1990). La transcription des gènes NS, à partir de promoteur P4, a lieu immédiatement suivant la conversion du génome simple-brin en la mRF (Deleu *et al.*, 1999).

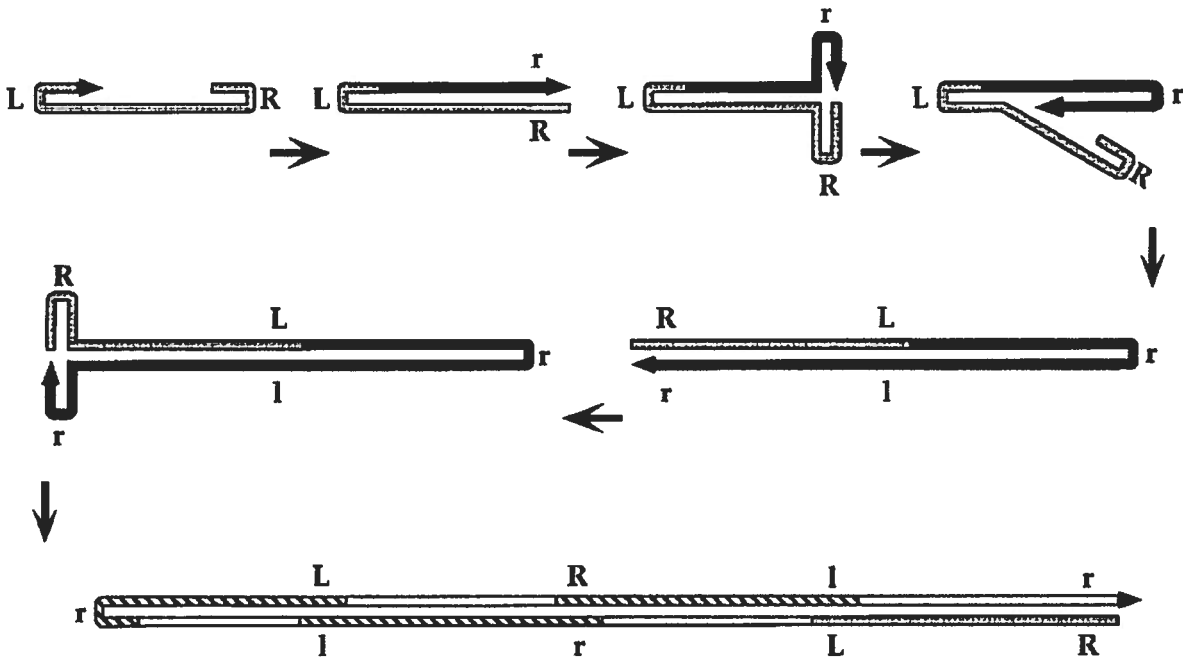


**Figure 13. Conversion du génome simple-brin en la matrice de transcription par le complexe de réplication de la polymérase  $\delta$ .** Les épingles terminales du génome se replient pour servir d'amorce à la polymérase lors de l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Voir le texte pour les détails. Tiré et modifié de (Bashir *et al.*, 2000).

Les étapes suivantes de la réplication du génome nécessitent alors la présence des oligomères phosphorylés de la protéine NS1, qui se lient à l'extrémité droite du génome (Cotmore, Christensen, et Tattersall, 2000; Willwand et al., 2002). Les activités endonucléase (Nuesch, Cotmore, et Tattersall, 1995; Rhode, 1989) et hélicase 3'-5' (Jindal et al., 1994) de la protéine permettent le déroulement du palindrome de droite afin que le complexe Pol $\delta$  (Christensen et Tattersall, 2002) puisse répliquer d'abord cette extrémité du génome puis de progresser le long du génome linéaire. Le palindrome de gauche est alors déroulé à l'aide de NS1 tandis que le brin déplacé sert de matrice pour la suite de la réplication suivant un mécanisme semblable à celui du cercle-roulant : le modèle de « l'épingle roulante » (rolling hairpin) (Figure 14) (Cotmore et Tattersall, 1995; Tattersall et Ward, 1976). Cette réplication génère des concatémères de longueurs différentes, dans lesquels les génomes sont juxtaposés gauche-gauche et droite-droite (Cotmore et Tattersall, 2006). Enfin, bien que les formes dimériques réplicatives (deux longueurs de génome, dRF) et d'ordres supérieurs soient discernables dans les cellules infectées, un amalgame de formes réplicatives est généré simultanément au cours de la réplication des parvovirus (Cotmore, Nuesch, et Tattersall, 1993; Cotmore et Tattersall, 1992; Cotmore et Tattersall, 2005b).

#### 5.2.1.1 *L'extrémité droite du génome : OriR et la résolution terminale*

Lors des premières étapes de la réplication du génome, l'extrémité droite fermée est repliée sur elle-même en conformation allongée. Les séquences de liaison [5'-TGGT-3']<sub>2-3</sub> et de clivage 5'-CTAT<sup>†</sup>TCA-3' de la NS1 constituent l'origine de réplication de l'extrémité droite du génome : OriR (Cotmore, Christensen, et Tattersall, 2000). Les protéines cellulaires HMG1/2 sont recrutées par des mécanismes inconnus au niveau de OriR et permettent d'activer la fonction endonucléase de la NS1 (Cotmore et Tattersall, 1998; Willwand et al., 1997). Le clivage d'un seul brin d'ADN libère l'extrémité 3'-OH nécessaire à l'assemblage d'une fourche de réplication (Cotmore et al., 1995; Cotmore, Gunther, et Tattersall, 1989). La protéine NS1 demeure liée à l'ADN clivé par l'extrémité 5'-P, au niveau du groupe hydroxyle de sa Tyr210 (Nuesch, Cotmore, et Tattersall, 1995). Puis, la phosphorylation de la NS1 par les PKC $\lambda$  et PKC $\eta$  au niveau des résidus T435 et S473 active l'hélicase virale



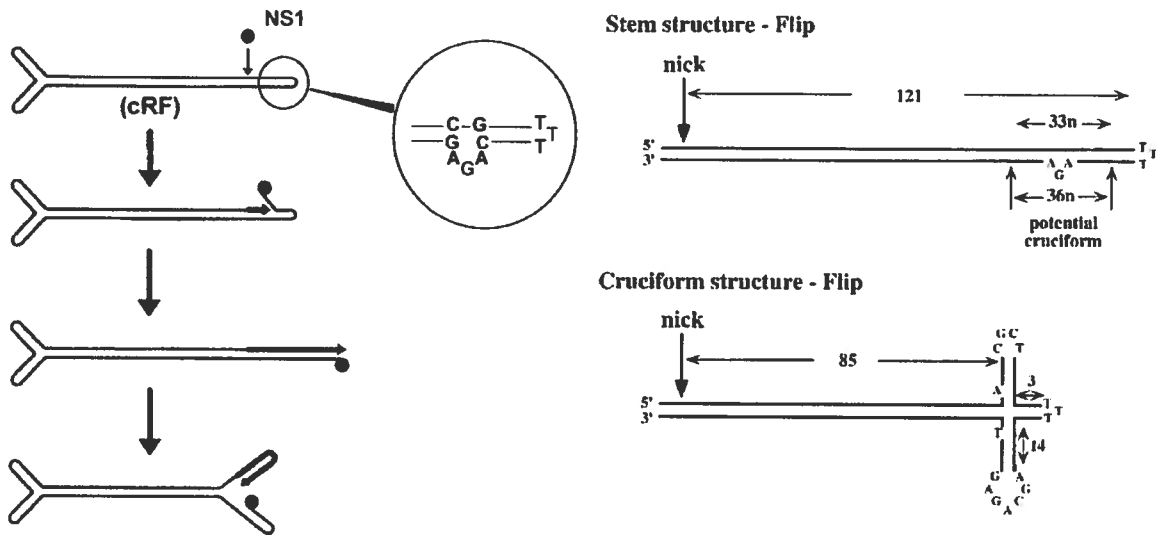
**Figure 14. Réplication du génome des Parvovirus par le modèle de « l'épingle roulante ».** Le génome simple-brin est copié sur le brin direct en continu, analogue à la réplication selon le modèle du cercle-roulant des procaryotes. Lorsque le complexe de polymérase atteint les épingles terminales, celles-ci sont déroulées puis se replient en déplaçant l'ancien brin génomique, générant les versions Flip et Flop en alternance à chaque ronde de réplication (symbolisée par R et r à l'extrémité droite, L et l à l'extrémité gauche). La processivité de la réaction génère des concatémères du génome, ceux-ci étant juxtaposés droite-droite et gauche-gauche. Voir le texte pour les détails. Tiré de (Cotmore et Tattersall, 1995).

dépendante de l'ATP (Dettwiler, Rommelaere, et Nuesch, 1999; Lachmann, Rommeleare, et Nuesch, 2003; Nuesch et al., 2003) pour dérouler le palindrome de droite et répliquer cette extrémité du génome (Baldauf *et al.*, 1997; Willwand *et al.*, 1998). De plus, comme les palindromes à chacune des extrémités du génome des parvovirus sont imparfaits, il s'ensuit que la séquence nouvellement répliquée du palindrome se trouve inversée par rapport à la première, ce qui génère les orientations Flip et Flop du palindrome de droite retrouvées chez les *Parvovirus* (Figures 15 et 2B) (Willwand *et al.*, 2002). Par la suite, lors du repliement du palindrome de droite, l'extrémité 3'-OH de la chaîne en cours d'élongation se lie à la base de la structure en croix afin de changer la direction de la fourche de réplication (Willwand *et al.*, 1998). L'élongation se poursuit alors jusqu'au palindrome de gauche, qui est déroulé puis répliqué tel que décrit ci-haut.

#### 5.2.1.2 *L'extrémité gauche du génome : OriL et la résolution asymétrique des jonctions dimériques*

La progression du complexe de réplication à travers le palindrome de gauche entraîne la juxtaposition des génomes « tête-à-tête » à la jonction dimérique (Cotmore, Nuesch, et Tattersall, 1993; Cotmore et Tattersall, 1992). L'imperfection de la séquence du palindrome de gauche forme une bulle entre les nucléotides non-appariés GAA et GA et un nucléotide « T » qui sont exclus du palindrome. Ainsi, dans la conformation allongée, la jonction dimérique est asymétrique.

La protéine NS1 se lie aux séquences en tandem 5'-TGGT-3' présentes de part et d'autre de la jonction (OriL<sub>TC</sub> et OriL<sub>GAA</sub>) afin de cliver un seul brin de l'ADN à quelques nucléotides en amont de son site de liaison (Figure 16) (Cotmore et al., 1995). Ce clivage requiert toutefois la participation de la protéine cellulaire PIF (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1997a), qui se lie aux deux séquences 5'-ACGT-3' en aval du site de liaison de NS1 (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1997b). La distance entre les sites de liaisons de la NS1 et de la PIF est cruciale, les deux nucléotides de la bulle GA permettant la formation du complexe de clivage et la présence d'un seul nucléotide supplémentaire, tel qu'au niveau de OriL<sub>GAA</sub>, empêche l'interaction entre les deux protéines (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 2001). Le clivage est donc asymétrique et a lieu uniquement du côté de la jonction dimérique portant OriL<sub>TC</sub> et la NS1 demeure liée de façon covalente à l'extrémité 5'

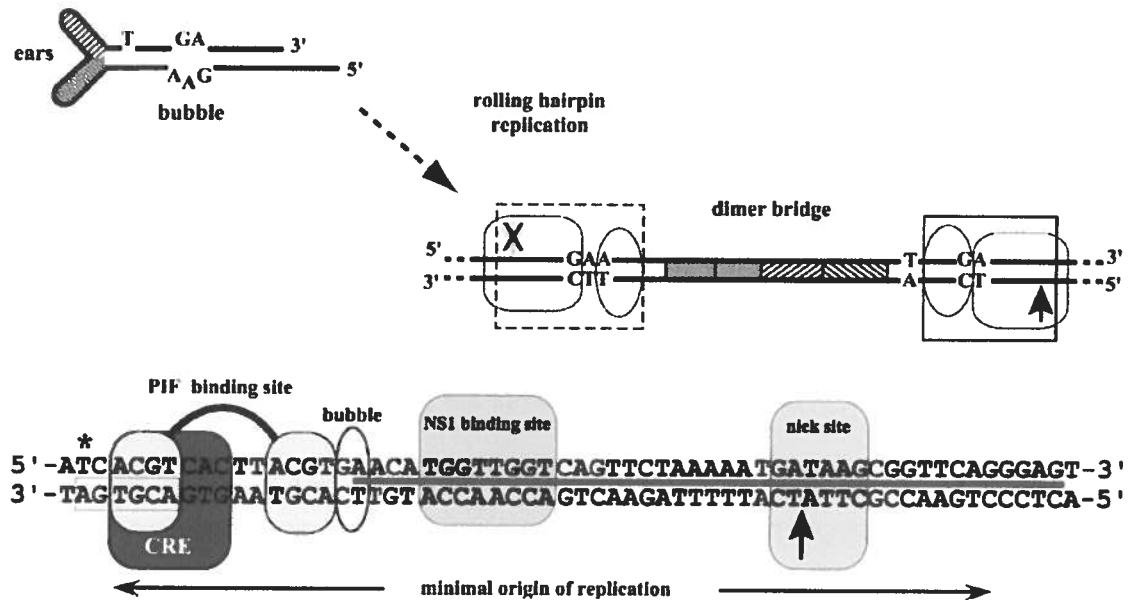


**Figure 15 Réplication de l'extrémité droite du génome.** La matrice de transcription générée au cours de l'infection est clivée au niveau de OriR, à l'extrémité droite du génome, par la protéine NS1. La présence d'une bulle formée par trois nucléotides chez le MVM permet de distinguer les orientations Flip et Flop. La séquence palindromique en conformation allongée (Stem Structure) porte aussi des palindromes internes qui entraînent le repliement en forme de croix (Cruciform structure). Le repliement en croix permet le changement de direction de la fourche de réplication. Voir le texte pour les détails. Tiré et modifié de (Baldauf *et al.*, 1997; Willwand *et al.*, 1997).

du brin clivé. La configuration du palindrome de gauche, en forme allongée ou repliée en croix, détermine alors la suite des événements de réplication (Cotmore et Tattersall, 2003).

Dans le premier cas, les structures secondaires de l'extrémité gauche sont pleinement déroulées et le complexe de réplication progresse de façon à générer les intermédiaires concatémériques du génome (figure 14). À l'opposé, lorsque les palindromes se replient avant l'assemblage d'une nouvelle fourche de réplication, le brin opposé est utilisé comme matrice pour le complexe de réplication (Figure 17). Ce procédé, catalysé par NS1 et la protéine de liaison à l'ADN simple-brin RPA, nécessite une série de changement de conformation des palindromes au cours de la synthèse (Christensen et Tattersall, 2002). La fourche de réplication copie successivement les divers bras de la structure en croix puis change d'orientation en utilisant le brin interne comme matrice. Ce processus est responsable de la génération de l'unique conformation Flip retrouvée à l'extrémité gauche des génomes de polarité négative chez les parvovirus (Cotmore, Nuesch, et Tattersall, 1992; Cotmore, Nuesch, et Tattersall, 1993; Cotmore et Tattersall, 2003). La nouvelle épingle (B-ta, figure 17) sert alors d'amorce pour les rondes subséquentes d'amplification.

Il a été proposé que l'intermédiaire  $\delta J$  subit ensuite un nouveau clivage par NS1 et le déroulement de l'épingle permettrait de synthétiser la conjonction dimérique à nouveau (en bas, figure 17) (Cotmore et Tattersall, 2006). Enfin, la résolution asymétrique de la jonction dimérique semble être essentielle pour la viabilité du MVM, puisque l'altération de l'asymétrie et l'activation artificielle de Ori<sub>L<sub>GAA</sub></sub> empêche la réplication du virus *in vitro* (Burnett, Cotmore, et Tattersall, 2006). Bien que les raisons fondamentales de l'existence de la seule orientation Flip du palindrome de gauche soient inconnues, il a été suggéré que cette configuration permettrait la ségrégation des génomes impliqués dans la réplication de ceux impliqués dans la transcription du gène précoce (Burnett et Tattersall, 2003). En effet, les sites de liaisons des facteurs de transcriptions du promoteur P4, dont la « cyclic AMP response element binding » (CREB)/ « Activation transcription factor 1 » (ATF), se trouvent aussi au niveau de l'épingle de gauche et sont superposés au site de liaison de la PIF. Cette stratégie permettrait donc de limiter l'accès des facteurs de réplication et de transcription à des molécules distinctes des intermédiaires de réplication (Burnett, Cotmore, et Tattersall, 2006; Cotmore et Tattersall, 2006).



**Figure 16. Résolution asymétrique de la jonction dimérique (OriL).** La jonction formée par la juxtaposition des extrémités gauches du génome (jonction dimérique) au cours de la réplication nécessite l'association entre la NS1 et la PIF pour le clivage. La bulle asymétrique du palindrome permet de distinguer deux origines de réplication (OriL<sub>TC</sub> et OriL<sub>GAA</sub>). La présence de deux nucléotides entre le site de liaison de la PIF et celui de la NS1 entraîne l'interaction des protéines et permet le clivage de l'origine OriL<sub>TC</sub> par la NS1. La présence de trois nucléotides entre les sites de liaison de la PIF et de la NS1 empêche l'interaction entre ces protéines de sorte que OriL<sub>GAA</sub> est inactive. Voir le texte pour les détails. Tiré de (Burnett et Tattersall, 2003; Nüesch, 2006).

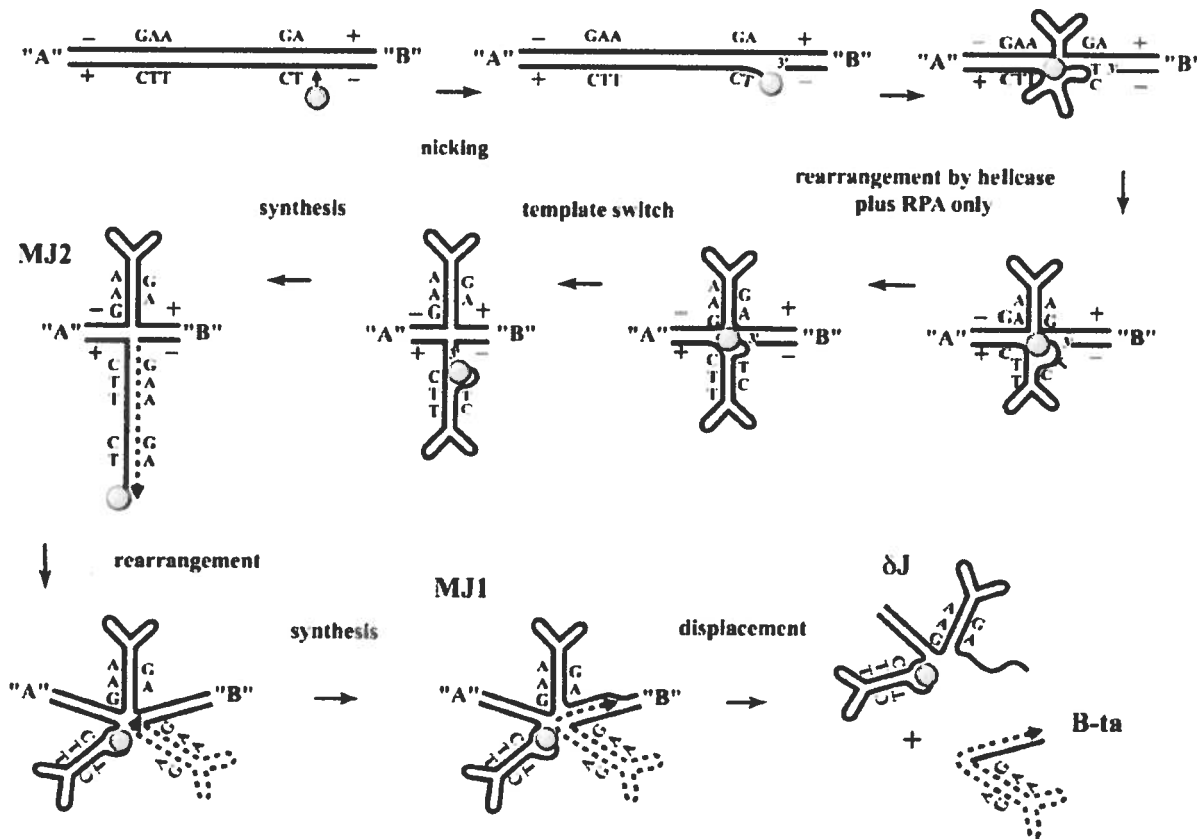


### 5.2.1.3 Résolution des jonctions dimériques chez le PPV

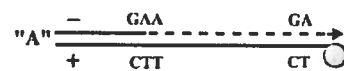
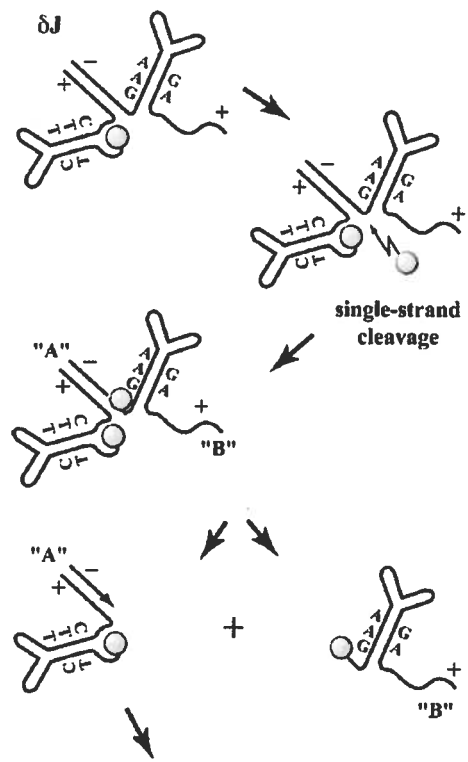
Le principe du clivage asymétrique décrit ci-haut est tiré d'études faites avec le virus MVM. Bien que tous les membres de genre *Parvovirus* portent les sites de liaison pour la NS1 et la PIF (Cotmore et Tattersall, 2006), une situation particulière est retrouvée dans le palindrome de gauche du PPV (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). D'une part, une seule séquence 5'-TGGT-3' est située à proximité de OriL chez le PPV, indiquant que le site de liaison de la NS1 de ce virus pourrait différer de celui des autres membres du même genre. De plus, le palindrome imparfait possède aussi une bulle, mais celle-ci compte seulement deux nucléotides de chaque côté (TG et AC). Les origines OriL chez le PPV ne sont donc pas asymétriques, suggérant que la protéine NS1 pourrait cliver de part et d'autre de la jonction dimérique. Pourtant, une seule orientation est connue pour l'extrémité gauche chez le PPV, comme chez les autres membres du genre *Parvovirus*. Ces observations suggèrent que les détails des mécanismes présentés ci-haut pourraient différer légèrement d'une espèce à l'autre. En effet, il a récemment été démontré que, chez le parvovirus Lulll, l'origine OriL est aussi active lorsque les palindromes sont repliés en forme de croix, ce qui n'est pas le cas chez le MVM, qui requiert la présence initiale de la forme allongée à la jonction dimérique (Diffoot-Carlo, Velez-Perez, et de Jesus-Maldonado, 2005). Ainsi, le modèle de réplication proposé pour Lulll conduit à la synthèse équimolaire de génomes de polarité négative et positive, pouvant porter l'une ou l'autre des orientations Flip et Flop aux palindromes terminaux. Il convient toutefois de noter que le virus Lulll est particulier au sein du genre *Parvovirus*, étant le seul qui encapside les génomes des deux polarités à fréquence égale (Bates *et al.*, 1984).

### 5.2.2 Contrôle de la transcription

La région en amont du promoteur précoce P4 porte de nombreux sites qui régulent la transcription. En effet, il existe une boîte TATA (Ahn *et al.*, 1989; Faisst *et al.*, 1994) et une région riche en CG pour la liaison de Sp1 (Ahn *et al.*, 1989; Fuks *et al.*, 1996; Pitluk et Ward, 1991), des sites pour la liaison des membres de la famille des Ets (Fuks *et al.*, 1996), de NF-Y (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1999; Gu *et al.*, 1995), de E2F (Deleu *et al.*, 1998; Fuks *et al.*, 1996), ainsi que des séquences « cyclic AMP response elements » (CRE)



**Figure 17. Résolution de la jonction dimérique.** Le clivage de la jonction dimérique par NS1 est suivi d'une série de changements de conformation en présence de la NS1 et de la RPA, permettant au complexe de réplication de changer de brin matrice et de copier la partie inférieure de la croix (MJ2). La réorganisation des palindromes permet ensuite de générer l'intermédiaire MJ1 à partir duquel le brin nouvellement copié du palindrome de gauche (en pointillé, B-ta) est libéré du complexe. B-ta porte ainsi l'orientation Flip. L'intermédiaire  $\delta J$  peut subir un deuxième clivage par NS1 pour reformer la conjonction dimérique « A » et une matrice de polarité positive « B » permettant la synthèse des brins négatifs. 000Tiré et modifié de (Cotmore et Tattersall, 2003).

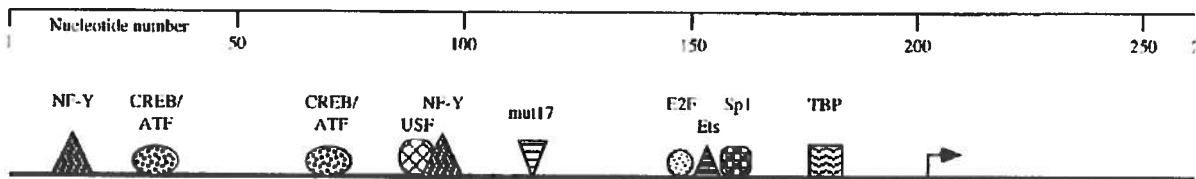


pour la liaison des membres de la famille CREB/ATF (Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1999; Perros et al., 1995; Perros et al., 1999) (Figure 18). L'activation du promoteur P4 a lieu au début de la phase S du cycle cellulaire, suite à la formation de la matrice de transcription mRF, par la liaison d'E2F sur l'ADN viral (Deleu *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 1999).

Par ailleurs, puisque ces premières étapes de transcription sont entièrement dépendantes des facteurs cellulaires, l'efficacité de l'activation du promoteur précoce constitue un des éléments contrôlant le tropisme des parvovirus (Davis et al., 2003; Itah, Tal, et Davis, 2004) ainsi que l'oncotropisme préférentiel de ces derniers (Cornelis et al., 1988b; Guetta et al., 1990; Paglino, Burnett, et Tattersall, 2007; Spegelaere et al., 1991). Notamment, l'activation du P4 peut être modulée à la hausse ou à la baisse par les interactions de la protéine CREB avec la GTPase Ras ou avec la Protéine Kinase A (PKA), respectivement (Perros *et al.*, 1995; Perros *et al.*, 1999). Suite à sa synthèse, la NS1 agit aussi comme régulateur de la transcription au niveau de son propre promoteur, mais les conséquences de sa liaison à l'ADN au niveau du P4 (et de OriL) dépendent de la réplication du génome (Hanson et Rhode, 1991). Quant à lui, le promoteur tardif porte aussi les séquences CG et la boîte TATA (Ahn, Pitluk, et Ward, 1992; Lorson et al., 1998; Lorson et Pintel, 1997), et la liaison de la NS1 au niveau du site *tar* est nécessaire pour l'activation (Abeygunasekara, Peat, et Ross, 2010; Christensen, Cotmore, et Tattersall, 1995; Doerig et al., 1988; Gu, Chen, et Rhode, 1992; Gu et Rhode, 1992; Lorson et al., 1996; Rhode, 1985). La protéine virale interagit directement avec Sp1, TBP et TFIIA pour permettre la transcription du gène *VP* (Kradly et Ward, 1995; Lorson et al., 1998).

### **5.2.3 Formation des corps de réplication nucléaires : APAR**

Afin de localiser toutes les composantes nécessaires à leur réplication, les parvovirus induisent la formation de structures nucléaires, nommés APAR, qui sont distinctes des corps PML, des speckles et des nucléoles (Cziepluch *et al.*, 2000). Ces structures comprennent la NS1 et plusieurs facteurs cellulaires nécessaires à la réplication du génome viral, notamment la cycline A, les polymérases  $\delta$  et  $\alpha$ , PCNA et RPA, (Bashir et al., 2000; Bashir, Rommelaere, et Cziepluch, 2001; Cziepluch et al., 2000). La protéine NS1 interagit aussi avec la protéine Smn lorsque les APAR s'agrandissent et deviennent



**Figure 18. Organisation des sites de liaison des facteurs de transcription au niveau de promoteur P4 chez le MVM.** Plusieurs facteurs de transcription peuvent se lier au niveau de l'extrémité gauche du génome, en amont du promoteur précoce P4. La transcription est initialement activée par la liaison de E2F, au début de la phase S, suite à la conversion du génome en la forme mRF. Tiré de (Deleu *et al.*, 1998).

indistincts des autres structures nucléaires telles que les corps Cajal, les corps PML, etc. (Young *et al.*, 2002a). La transcription des gènes viraux et l'assemblage des virions ont lieu au niveau de ces SAAB, qui sont aussi colocalisées avec la protéine NS2 (Young *et al.*, 2002b; Young *et al.*, 2005) et une ribonucléoprotéide nucléaire spécifique à NS1 (NSAP1 ou hnRNP Q) (Harris, Boden, et Astell, 1999) qui peut elle-même s'associer à SMN (Young *et al.*, 2002a; Young *et al.*, 2002b). Finalement, bien que les composantes de ces structures nucléaires aient été identifiées, les mécanismes entraînant leur formation demeurent encore obscurs.

## **5.3 Étapes tardives de l'infection**

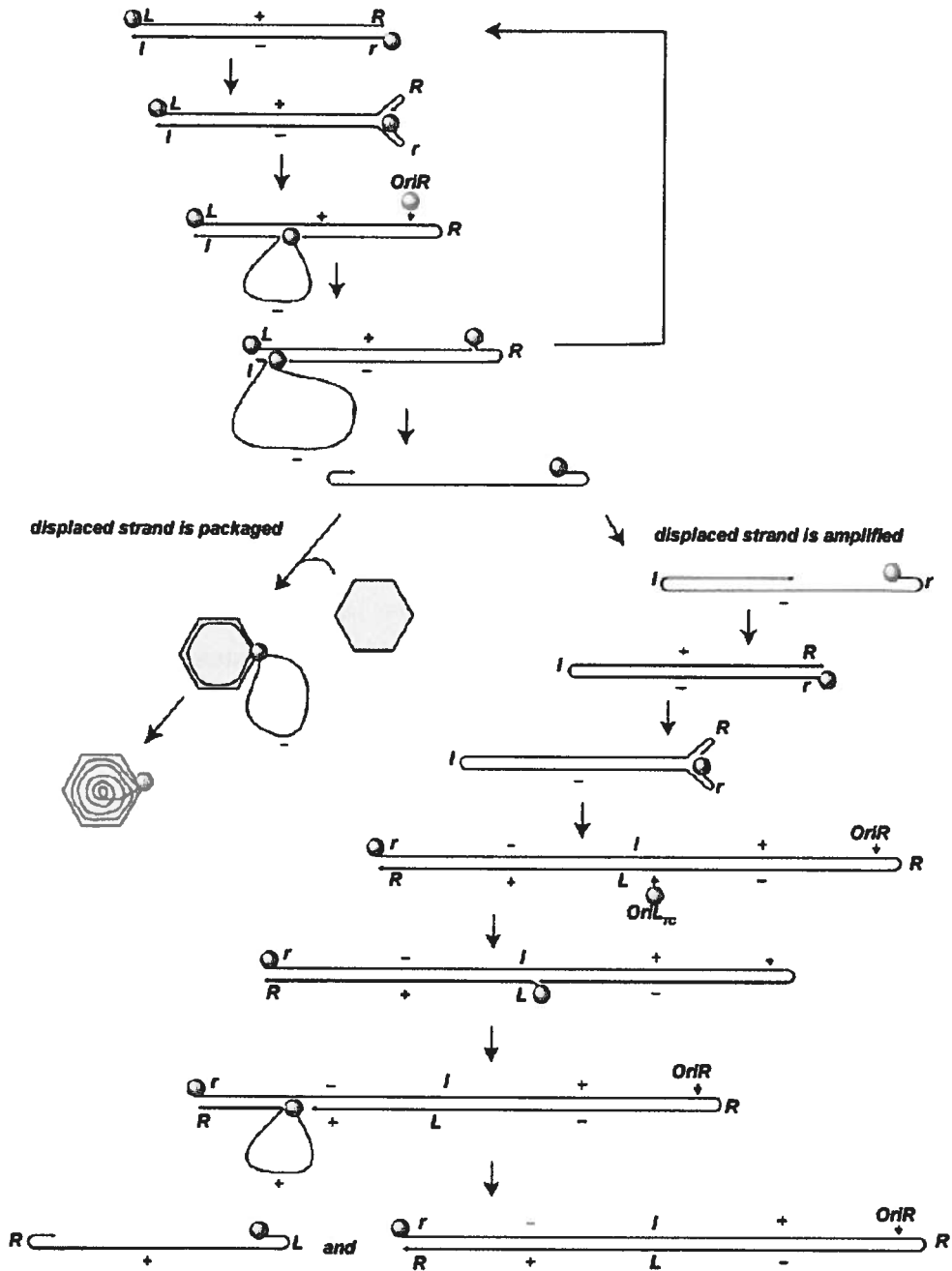
### **5.3.1 Libération du génome simple-brin et modèle d'encapsidation**

Les mécanismes menant à l'encapsidation du génome des parvovirus ne sont pas très bien définis. En effet, bien que plusieurs études aient suggéré un rôle pour la protéine NS2 dans l'accumulation des génomes simples brins, ces effets dépendent de l'origine de la cellule hôte (Cotmore *et al.*, 1997; Naeger, Cater, et Pintel, 1990; Naeger, Salome, et Pintel, 1993). De plus, aucun complexe d'encapsidation n'a été identifié, suggérant que l'interaction entre la NS1 liée de façon covalente au génome est suffisante pour permettre l'insertion du génome dans des capsides préformées (Cotmore et Tattersall, 2005a). L'encapsidation préférentielle des génomes d'une ou l'autre polarité résulte ultimement de l'efficacité du clivage par la NS1 au niveau de OriR (Cotmore et Tattersall, 2005b). Lors du processus de résolution terminale au palindrome de droite, une copie du génome de polarité négative peut être libérée des concatémères de réplication. Cette copie peut être recrutée aux capsides assemblées dans le noyau lors des étapes tardives de l'infection (Figure 19) (Cotmore et Tattersall, 1995; Cotmore et Tattersall, 2005b). Chez le parvovirus Lull, qui encapside les génomes des deux polarités, la séquence de OriR contient une insertion de deux nucléotides au site de clivage de NS1 qui la rend sous-optimale. Ainsi, les séquences de clivage au niveau de la jonction dimérique (palindrome de gauche) et celles situées à l'extrémité droite auraient des affinités équivalentes, ce qui entraînerait la libération des génomes de chacune des polarités à fréquence égale (Cotmore et Tattersall, 2006).

Par ailleurs, chez les virus qui excisent préférentiellement le génome d'une seule polarité, l'encapsidation semble procéder par un mécanisme bi-phasique. Ainsi au début de la phase d'encapsidation, la réplication du génome entraîne l'excision d'ADN viral simple-brin des deux polarités et ceux-ci pourraient être réutilisés à titre de matrices supplémentaires pour la réplication. Lorsque les génomes d'une polarité sont encapsidés de façon préférentielle, ils sont exclus du pool de réplication, limitant l'excision du génome de polarité opposé au cours des cycles de réplication suivant (Cotmore et Tattersall, 2005b). L'hélicase dépendant de l'ATP de la NS1 permettrait l'insertion des génomes en direction 3'-5' dans des capsides préformées où la partie 2Nt de VP2 est préalablement externalisée (Cotmore et Tattersall, 2005a). Le début de l'encapsidation est rapide, permettant l'insertion d'environ 2kb du génome à l'intérieur de la capsid et se poursuit par une deuxième phase plus lente (Cotmore et Tattersall, 2005a). L'isolement de génomes chimériques partiellement encapsidés a démontré qu'un signal quelconque, possiblement des structures secondaires présentes exclusivement dans le génome de polarité positive du MVM, empêche l'encapsidation du dernier 3kb du génome. Ces signaux « de blocage » sont absents dans le génome de polarité négative, de sorte qu'il est difficile d'isoler des particules où le génome de polarité négative n'est que partiellement encapsidé (Cotmore et Tattersall, 2005b). Par la suite, lorsque les génomes d'une polarité sont encapsidés de façon préférentielle, ils sont exclus du pool de réplication, limitant ainsi l'excision du génome de polarité opposé au cours des cycles de réplication suivant (Cotmore et Tattersall, 2005b). Enfin, bien que les mécanismes d'encapsidation préférentielle commencent à être élucidés, les raisons pour lesquelles la plupart des membres du genre *Parvovirus* ont évolué de façon à favoriser l'encapsidation d'une polarité du génome plutôt que l'autre demeurent incertaines.

### **5.3.2 Assemblage des virions et libération des virions**

Les capsides des parvovirus s'assemblent dans le noyau des cellules infectées. Au cours des dernières années, les mécanismes permettant la formation des sous-unités de la capsid, leur transport nucléaire et leur assemblage, ainsi que l'encapsidation du génome et la libération des virions néo-synthétisés ont commencé à être définis. Tel que mentionné précédemment, selon l'analyse du degré d'interaction entre les différentes protéines de la capsid, l'une des sous-unités des plus stables serait le trimère homo- ou oligomérique,



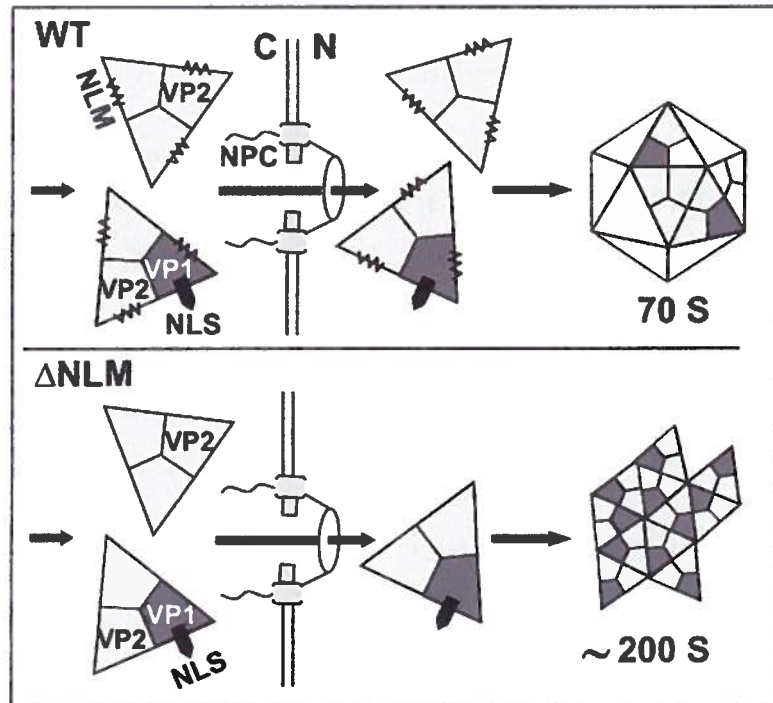
**Figure 19. Encapsidation préférentielle du génome de polarité négative chez la plupart des membres du genre *Parvovirus*.** Le clivage au niveau de OriR est plus efficace que le clivage de OriL chez la plupart des *Parvovirus*. Lors de ce clivage, une copie du génome de polarité négative peut être excisée du génome. Lorsque ce brin est encapsidé, il n'est pas recyclé dans le pool de réplication. À l'opposé, si ce brin est retourné au pool de réplication et que le clivage au niveau de OriL est aussi efficace qu'au niveau de OriR, des quantités équimolaires des génomes de chacune des polarités sont déplacées du génome pour être encapsidés, tel qu'il est observé chez le Parvovirus Lull1. Voir le texte pour plus de détails. Tiré de (Cotmore et Tattersall, 2005b).

formée de trois copies de la VP2 ou de deux copies de la VP2 et une de la VP1 (Tsao *et al.*, 1991). Cette hypothèse a été confirmée par la facilité avec laquelle ces sous-unités peuvent être chimiquement réticulées et purifiées *in vitro* (Riolobos *et al.*, 2006) et par la formation d'un NLM à la surface interne des trimères (Lombardo *et al.*, 2000). La coopération entre les NLS de VP1up et du NLM entraîne l'import stoéchiométrique des sous-unités qui peuvent ensuite s'assembler en capsides vides (Figure 20) (Lombardo *et al.*, 2002). Les extrémités N-terminales des protéines VP2 et VP1 se trouvent alors à l'intérieur de la capside (Weichert *et al.*, 1998). L'externalisation de la région 2Nt précède la translocation du génome dans la capside en direction 3'-5' via l'activité hélicase de la NS1 (Cotmore et Tattersall, 2005a). Tel que mentionné précédemment, la NS2 aurait un rôle à jouer dans l'export nucléaire des virus nouvellement formés (Engelsma *et al.*, 2008), en permettant de faire un lien indirecte entre la Crm1 et la capside, tandis que la NS1 entraîne la phosphorylation de la 2Nt (Maroto *et al.*, 2004) par l'entremise de PKC $\eta$ , de Radixine et de CKII $\alpha$  (Figure 8) (Nuesch *et al.*, 2009). Enfin, ces études récentes sur les étapes tardives de l'infection par les parvovirus indiquent qu'une forte proportion de virions est donc relâchée dans le milieu extracellulaire bien avant le début de la lyse de la cellule.

### 5.3.3 Remodelage de la cellule lors des effets cytopathiques

La plupart des membres du genre *Parvovirus* sont reconnus pour induire des effets cytopathiques prononcés qui entraînent la lyse des cellules à la suite de l'infection (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990). Toutefois, la lyse ne résulte pas d'une dégradation de toutes les structures de la cellule, mais plutôt d'un processus spécifique qui ne commence qu'à faire l'objet d'études (Nuesch, Lachmann, et Rommelaere, 2005). Ainsi, il a été démontré que l'intégrité des microtubules et la membrane nucléaire demeurent essentiellement intouchées jusqu'aux étapes précédant l'arrondissement et le décollement des cellules en culture. À l'opposé, l'organisation des filaments d'actine est altérée et la vimentine des filaments intermédiaires, qui sont majoritairement responsables de la forme des cellules eucaryotes, s'accumule autour du noyau dès 10h post-infection dans les cellules synchronisées. Il a été démontré que l'association de la NS1 et de la CKII $\alpha$  induit une phosphorylation spécifique de la gelsoline (Bar *et al.*, 2008), une protéine responsable du sectionnement des filaments d'actine. Cette dernière est graduellement augmentée lors de l'infection





**Figure 20. Rôles complémentaires des signaux de localisation nucléaires des protéines VP dans le transport des sous-unités trimériques et dans l'assemblage de la capsid.** Les NLS portés par la VP1 suffisent à l'import nucléaire de trimères formés par VP1 et VP2. L'assemblage de ceux-ci résulte toutefois à la formation d'aggrégats ayant un coefficient de sédimentation élevé (200S). Le NLM à la surface interne des trimères permet l'import des trimères formés uniquement de la VP2 permettant l'assemblage de capsid normales. Tiré et modifié de (Riobos et al., 2006).

(Nuesch, Lachmann, et Rommelaere, 2005) et est responsable du remodelage prononcé du réseau d'actine. Au contraire, la protéine du syndrome Wiscott-Aldrich (WASP, Wiscott-Aldrich Syndrome Protein), une protéine activatrice du complexe Arp2/3 de la polymérisation d'actine est dégradée au cours de l'infection (Nuesch, Lachmann, et Rommelaere, 2005) suggérant que cette régulation à la baisse contribue au remodelage en réduisant la nouvelle polymérisation de ces filaments (Bar *et al.*, 2008). Ces modifications du réseau de l'actine, induites par la phosphorylation de la gelsoline par NS1/CKII $\alpha$ , pourraient permettre l'assemblage et/ou le transport de vésicules semblables aux endosomes qui contiennent les virions néoformés à la fin de l'infection (Bar *et al.*, 2008).

L'observation que le réseau de microtubules demeure indemne jusqu'à la lyse induite par le MVM suggère que ces filaments sont spécifiquement protégés lors de l'infection. En effet, il a été démontré que l'infection par ce parvovirus induit une augmentation de la phosphorylation de la  $\alpha/\beta$ -tubuline par PKC $\lambda$ , et que ceci serait l'une des conséquences de l'interaction de la kinase avec la NS1. Ainsi, la protéine multifonctionnelle NS1 semble subvertir indirectement les structures de la cellule afin de permettre l'exocytose des virions avant la lyse de la cellule.

## 6. Tropisme

Le tropisme d'un virus, c'est-à-dire sa capacité de compléter un cycle de réplication productif dans un type de cellule donnée, peut être déterminé à diverses étapes. Ceci est d'autant plus vrai quand le virus en question utilise des récepteurs ubiquitaires pour l'attachement à la surface cellulaire (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Nam *et al.*, 2006), qu'il est internalisé au moins en partie par des processus non-spécifiques (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010) et qu'il dépend hautement des fonctions cellulaires pour toutes les étapes de sa réplication. Tel est le cas chez les *Parvovirus* en général et particulièrement pour le PPV, pour lequel la plupart des informations concernant sa réplication sont déduites d'études faites sur les virus apparentés, sans toutefois qu'elles aient été vérifiées de façon expérimentale.

## 6.1 Effets de la transformation cellulaire

La transformation cellulaire permet souvent d'augmenter la permissivité des cultures envers les parvovirus, bien que ceci ne dépende pas de l'agent transformant (Faisst, Schlehofer, et zur Hausen, 1989). Cette sensibilité accrue est plutôt entraînée par l'activation de facteurs cellulaires, qui sont aussi dépendants de l'état de différenciation des cellules et de l'expression de divers oncogènes (Chen et al., 1989; Cornelis et al., 1988a; Faisst, Schlehofer, et zur Hausen, 1989; Salome et al., 1990; Salome et al., 1989; Van Hille et al., 1989). En effet, tel que mentionné précédemment, la phosphorylation des trimères de VP par Raf-1 influe sur l'efficacité du transport nucléaire des sous-unités de la capsid et donc sur la productivité de l'infection (Riolobos *et al.*, 2010), tandis que l'expression de l'oncogène Ras augmente l'activation du promoteur précoce via la protéine CREB (Perros *et al.*, 1995). D'autres études ont aussi démontré que certaines lignées transformées avaient une capacité accrue à supporter la réplication du génome viral (Chen et al., 1986; Cornelis et al., 1988a; Mousset et Rommelaere, 1988) et la transcription des gènes viraux (Cornelis *et al.*, 1990; Cornelis *et al.*, 1988b; Spegelaere *et al.*, 1991; Van Hille *et al.*, 1989). De plus, la cytotoxicité des protéines non-structurales des parvovirus étaient augmentées dans plusieurs lignées transformées par rapport aux lignées parentales (Guetta *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1992; Salome *et al.*, 1989; Spegelaere *et al.*, 1994). Dans un cas particulier, il a été démontré que la résolution des concatémères du génome générés lors de la réplication du MVM était favorisée dans une lignée de fibroblastes pulmonaires humains transformée avec le SV40 par rapport aux cellules parentales. Ceci a été attribué à l'activité des protéines HMG1 et à l'augmentation de la disponibilité de PCNA dans ces cellules (Kuntz-Simon *et al.*, 1999). La majorité des effets oncolytiques des parvovirus est toutefois reliée de façon plus ou moins direct à l'expression de la NS1, soit par la stimulation de la transcription à partir du promoteur P4 (Perros *et al.*, 1995; Perros *et al.*, 1999; Vanacker *et al.*, 1996), par l'augmentation de la traduction de l'ARNm R1 (Ventoso, Berlanga, et Almendral, 2010) ou par l'augmentation de la susceptibilité des cellules aux actions cytotoxiques de la protéine (revue dans (Rommelaere *et al.*, 2010). Finalement, il a récemment été démontré que l'oncotropisme préférentiel du MVM peut aussi résulter de l'absence d'induction d'une réponse antivirale au niveau de la cellule hôte (Grekova *et al.*, 2010). En effet, la sensibilité de cellules primaires à l'infection par le MVM était augmentée lorsque celles-ci étaient préalablement traitées avec un anticorps dirigé contre l'interféron  $\beta$ .

De plus, il a été proposé que la permissivité des fibroblastes A9 murins envers le MVM soit due, entre autres, à l'absence de production des IFN de type-I. Toutefois, puisqu'il a déjà été démontré que le PPV est insensible à ces molécules de la réponse antivirale (Derbyshire, 1989), ce mécanisme favorisant l'oncotropisme pourrait différer entre les membres du genre *Parvovirus*.

## 6.2 Tropisme des espèces du genre *Parvovirus*

Plusieurs membres du genre *Parvovirus* comptent plus d'une souche officiellement reconnue par l'ICTV. En effet, le MVM comprend les souches MVMp, MVMi et MVMc, les virus de la panleucopénie féline compte les souches FPV, CPV, MEV et RPV tandis que le PPV inclut les souches NADL-2 et Kresse (Tattersall, 2006). Le tropisme *in vitro* et *in vivo* des souches de chaque espèce diffère et comprend une gamme de cellules susceptibles qui ne sont pas nécessairement réciproques (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996; Brownstein et al., 1991; Kontou et al., 2005; Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1993; Parrish et al., 1987; Tattersall et Bratton, 1983; Truyen et Parrish, 1992). Chez ces espèces de *Parvovirus*, une partie des déterminants allotropiques se situent au niveau des protéines structurales (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996; Gardiner et Tattersall, 1988a; Parrish, Aquadro, et Carmichael, 1988; Parrish et Carmichael, 1986; Spitzer, Parrish, et Maxwell, 1997), bien que le tropisme puisse être déterminé ailleurs qu'à la surface cellulaire, notamment pour le MVM et le PPV (Horiuchi et al., 1992; Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1992; Ridpath et Mengeling, 1988; Spalholz et Tattersall, 1983).

### 6.2.1 Tropisme du FPV

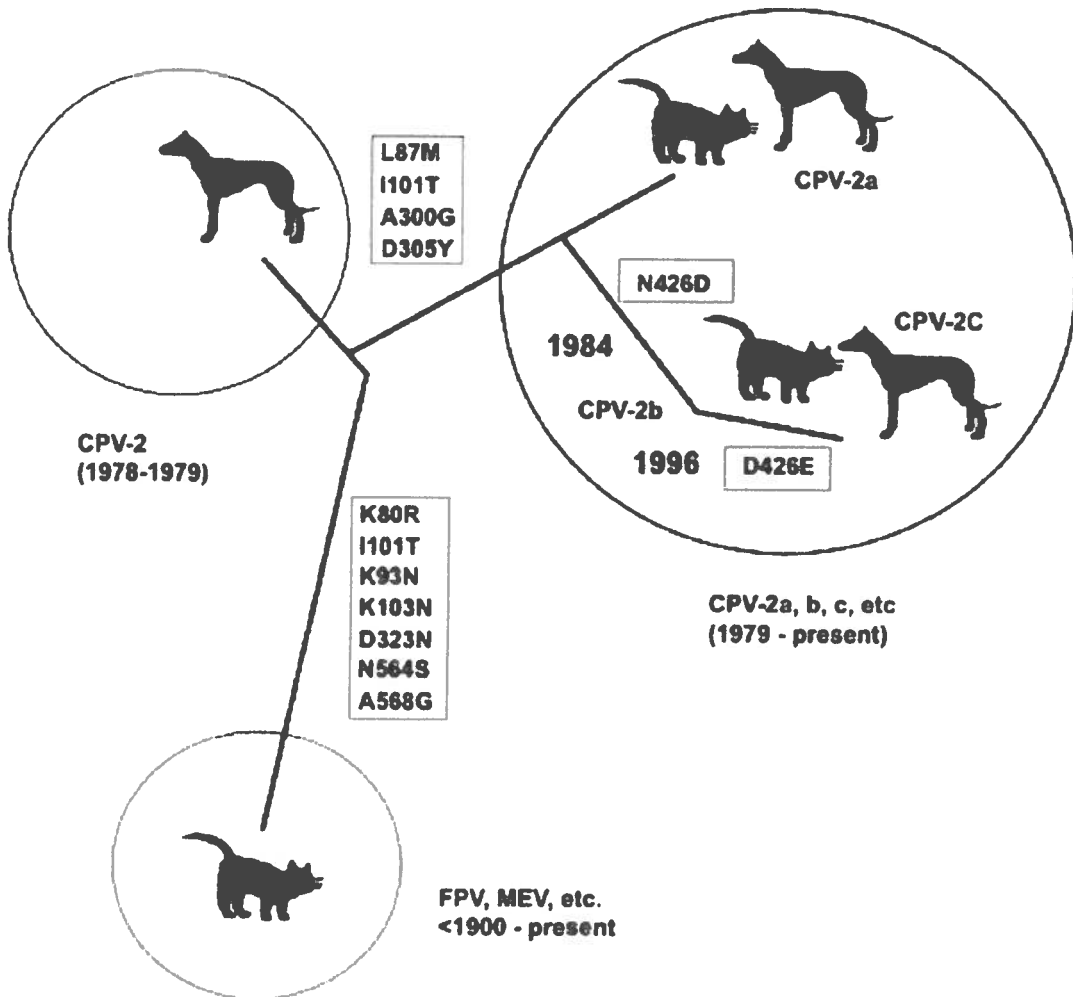
Chez les virus de la panleucopénie féline, le principal déterminant du tropisme constitue l'attachement à la surface cellulaire, au niveau du TfR (Hueffer et al., 2003). Le changement des acides aminés K93N et D323N entre les VP du FPV et du CPV est suffisant pour permettre la liaison au TfR canin (Chang, Sgro, et Parrish, 1992; Hueffer et al., 2003). D'autres substitutions à proximité des spicules sur la surface de la capsid influent toutefois sur l'efficacité de l'infection de cellules canines ou félines (Figure 21). Il a été démontré que le CPV a effectivement évolué à partir du FPV (Hueffer et Parrish, 2003;

Shackelton et al., 2005; Truyen et al., 1996), en acquérant des mutations au niveau de la VP2 qui ont permis l'adaptation aux chiens au cours de 1978-79, soit la souche CPV-2, puis une évolution permettant le retour à la capacité d'infecter aussi les chats à la fin 1979, soit la souche CPV-2a (Hoelzer et Parrish, 2010). La plupart des variants de CPV qui circulent à l'heure actuelle sont regroupés sous le clade CPV-2a et tirent leur origine d'un ancêtre commun.

### 6.2.2 Tropisme du MVM

Pour leur part, les mécanismes influençant le tropisme dans les cellules murines des souches lymphotropiques (MVMi : immunosuppressive) et fibrotropiques du parvovirus murin (MVMp : prototype), sont un peu plus complexes. La souche MVMi, entraîne une suppression des fonctions des cellules T *in vitro* mais l'infection de fibroblastes murins n'est que faiblement productive (Engers *et al.*, 1981) tandis que l'inverse est vrai pour la souche MVMp (Tattersall et Bratton, 1983). *In vivo*, l'infection de souris néo-natales est asymptomatique avec MVMp mais fatale avec la souche MVMi (Brownstein *et al.*, 1992). Il a été démontré que le tropisme de ces souches était déterminé par des facteurs intracellulaires résultant en une faible amplification du génome viral et une expression réduite des protéines VP dans les cellules restrictives (Spalholz et Tattersall, 1983).

Tel qu'observé chez les souches de FPV/CPV, le déterminant allotropique du MVM se situe au niveau de la capsid virale (Gardiner et Tattersall, 1988a). La capacité d'infecter les fibroblastes peut être conférée au MVMi par les substitutions A317T et E321G, soit les acides aminés trouvés chez la souche MVMp (Ball-Goodrich, Moir, et Tattersall, 1991; Ball-Goodrich et Tattersall, 1992). Le changement réciproque de ces résidus au niveau de la souche MVMp est toutefois insuffisant pour lui conférer le phénotype lymphotrope (Previsani *et al.*, 1997). Une série de substitutions, toujours au niveau du gène VP, peut aussi être sélectionnée par passage forcé du MVMi dans les fibroblastes murins (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998), suggérant fortement que la capsid ou les protéines structurales sont majoritairement impliquées dans ces phénotypes (Kontou *et al.*, 2005). Toutefois, tel que mentionné précédemment, l'efficacité de l'épissage de la NS2 est aussi favorisée dans les cellules hôtes du MVMi ou du MVMp, ce qui se traduit en une augmentation de la



**Figure 21. Évolution et émergence des souches du FPV.** Les études de la phylogénie des souches appartenant à l'espèce de la panleucopénie féline ont déterminé que la souche CPV est apparue à la fin des années 1970, à la suite d'une série de mutations qui ont permis l'infection de cellules canines. L'évolution subséquente de la souche a permis à ce virus d'infecter à nouveau les félins (CPV-2a). Pour sa part, la souche MEV aurait divergé du FPV avant le 20<sup>e</sup> siècle. Tiré de (Hoelzer et Parrish, 2010).

production de la petite protéine non-structurale (Choi et al., 2005; Colomar, Hirt, et Beard, 1998; Gardiner et Tattersall, 1988b). Puisque la NS2 est impliquée dans l'assemblage et dans l'export des capsides dans divers types de cellules, il est envisageable qu'un lien indirect existe entre ces protéines favorisant ainsi la réplication de l'une ou l'autre des souches virales, selon le type cellulaire. Lors de l'infection de cellules d'origines humaine, les protéines NS des deux souches ont aussi été impliquées dans les différences d'accumulation des formes répliquatives du génome et dans la productivité de l'infection, suggérant que le tropisme des souches de MVM est gouverné à diverses étapes (Rubio, Guerra, et Almendral, 2001).

### 6.2.3 Tropisme du PPV

Comme chez le MVM, le tropisme du PPV est déterminé majoritairement par des facteurs intracellulaires (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1992; Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1993; Ridpath et Mengeling, 1988). En effet, l'internalisation du PPV est aussi efficace dans les cellules restrictives et permissives (Ridpath et Mengeling, 1988), ce qui peut être expliqué par l'implication de la macropinocytose, un processus non-spécifique, pour l'entrée des virions dans les cellules (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). D'ailleurs, la transfection de cellules restrictives à l'infection n'entraîne pas la production de virions, suggérant que les différences de permissivité des cellules résultent de l'expression de cofacteurs cellulaires nécessaires aux étapes subséquentes à la conversion du génome en sa forme bicaténaire (Ridpath et Mengeling, 1988). Une étude avait démontré que l'infection de cellules MDCK (madin-darby canine kidney) par la souche NADL-8 entraîne une faible amplification du génome et seuls les transcrits du promoteur P40 étaient détectables dans ces cellules malgré l'absence de synthèse de protéines virales (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1992). D'autre part, une étude portant sur une souche de PPV ayant acquis la capacité d'infecter des cellules canines *in vitro* a aussi démontré qu'une partie de la région codante pour les protéines NS ainsi qu'une courte région dans le gène VP étaient responsables de l'adaptation de ce virus (Vasudevacharya et Compans, 1992).

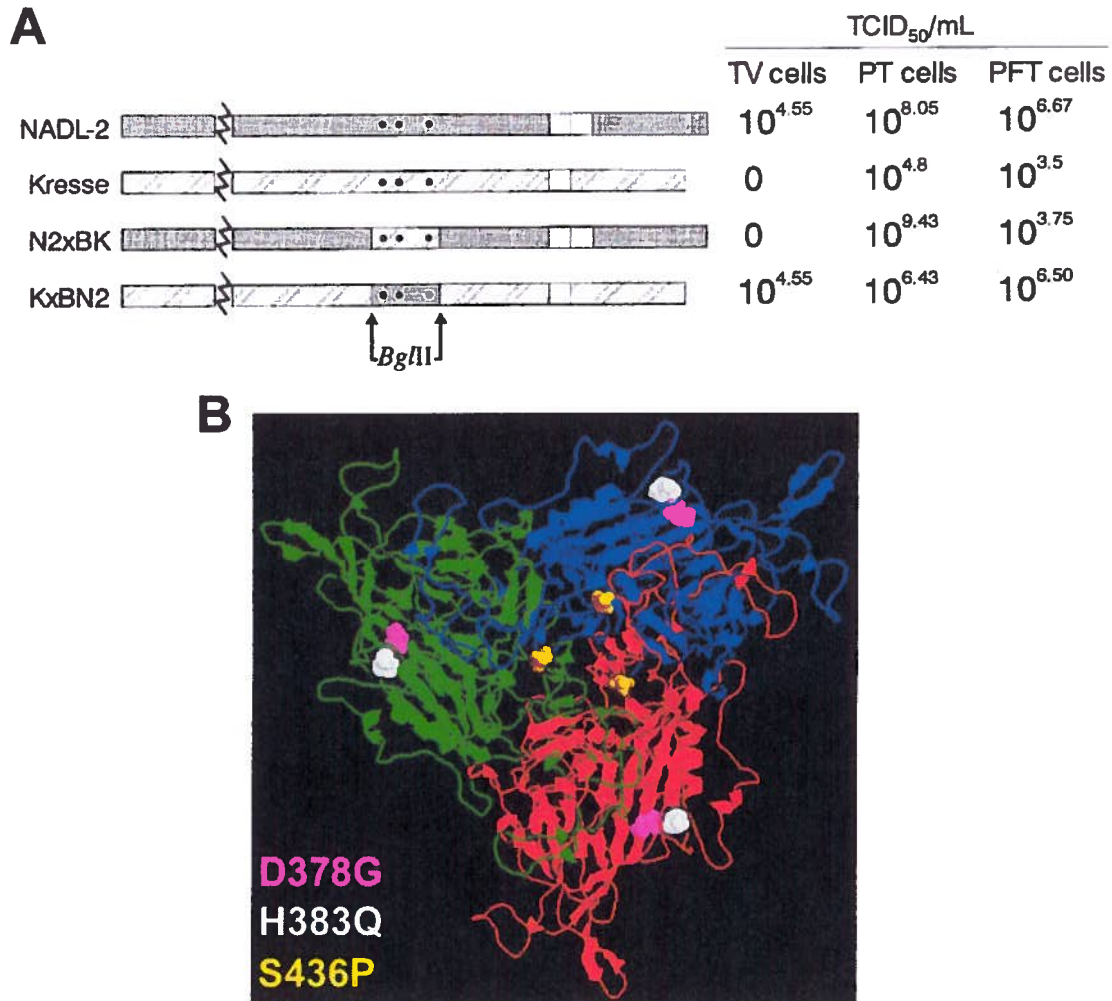
Notre laboratoire a effectué le séquençage du génome complet des souches NADL-2 (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993) et Kresse (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). La comparaison de ces deux souches prototypes a démontré que celles-ci avaient une très

forte identité de séquence. En effet, elles ne diffèrent qu'en 13 nucléotides sur l'ensemble de la région codante ainsi qu'au niveau d'une séquence répétée de 127 nucléotides, en aval de la région codante des protéines VPs, observée chez NADL-2. Par ailleurs, au niveau du gène *NS*, les cinq substitutions sont silencieuses tandis que les six substitutions non-synonymes se situent au niveau des protéines VP. Deux autres substitutions silencieuses se situent aussi dans le gène *VP*.

Malgré cette forte conservation de séquence, les souches Kresse et NADL-2 se répliquent avec des efficacités différentes en culture cellulaire. En effet, il a été démontré que l'infection de cellules de testicules porcines « porcine testis » (PT) était plus fortement productive avec la souche NADL-2 que la souche Kresse (Figure 22A) (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Par ailleurs, l'infection d'une culture primaire de cellules de testicules de veau (TV) n'était productive qu'avec la souche NADL-2. L'échange d'un fragment de restriction *Bgl*II du génome entre ces souches de PPV a permis de déterminer que cette région, portant trois différences en acides aminés (D378G, H383Q et S436P, numérotation de la VP2) sur les protéines VP, constitue le déterminant allotropique. En effet, l'infection des cellules TV est productive avec le clone KxBN2, qui porte les résidus D378, H383 et S436 de NADL-2 sous un fond génétique de la souche Kresse, tandis qu'elle ne l'est pas avec le clone inverse, soit N2xBK.

Par ailleurs, ce déterminant allotropique est aussi impliqué dans l'efficacité de l'infection de la lignée de cellules de trompes de Fallope porcines (Porcine Fallopian tube ou PFT), les titres viraux étant plus élevés lors de l'infection avec NADL-2 ou KxBN2. Toutefois, dans la lignée de cellules PT, les titres développés au cours de l'infection par l'une ou l'autre de ces chimères étaient plus élevés que ceux des souches parentales respectives. Ceci suggère donc que d'autres différences entre le génome de NADL-2 et de Kresse sont impliquées dans le contrôle du tropisme. Enfin, puisque les substitutions portées au niveau du déterminant allotropique sont situées près de la surface externe de la capsid, il a été suggéré que celles-ci pourraient interagir de façon différentielle avec des cofacteurs cellulaires au cours de l'infection (Figure 22B) (Simpson *et al.*, 2002).





**Figure 22. Déterminant allotropique des souches Kresse et NADL-2 du PPV sur les cellules primaires TV. A.** Le fragment de restriction *Bg*II du génome des souches NADL-2 et Kresse, portant trois substitutions dans les protéines VPs, permet l'échange des phénotypes de réplication sur les cellules primaires bovine TV et sur la lignée porcine PFT. Tiré de (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). **B.** Deux des trois différences (D379G et H383Q) sont situés près de l'une et l'autre lors du repliement des protéines, tandis que le troisième résidu se trouve sur le spicule à l'axe de symétrie 3, tel qu'illustré au niveau du trimère. Tiré et modifié de (Simpson *et al.*, 2002).

## 7. Hypothèse et objectifs du projet

Les travaux de Bergeron *et al.* ont permis d'identifier un déterminant allotropique des souches prototypes du PPV, NADL-2 et Kresse, dans des cellules bovines primaires TV (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Ainsi, les cellules TV constituent un modèle pour l'étude de l'allotropisme du PPV *in vitro*. Bien que les résidus portés par le déterminant allotropique pour les cellules TV se trouvent au niveau des protéines VP, notre hypothèse de travail propose qu'il existe d'autres déterminants génétiques allotropiques qui permettent d'altérer l'efficacité de la réplication des souches de PPV dans divers types de cellules. Ces autres déterminants agissent à de nombreuses étapes du cycle de réplication, de sorte que le tropisme du PPV n'est pas déterminé à la surface cellulaire.

Les objectifs du présent travail étaient donc :

- 1) D'identifier les étapes de la réplication virale qui diffèrent lors de l'infection par chacune des souches de PPV dans des lignées établies à partir des cellules primaires TV et dans les cellules porcines PT.
- 2) De caractériser les éléments génétiques impliqués dans l'allotropisme de deux souches prototypes du PPV.

# **Premier article**

Plusieurs étapes du cycle infectieux du Parvovirus Porcin sont impliquées dans le contrôle du tropisme des lignées cellulaires bovines

## Résumé du premier article

Fernandes, S., Boisvert, M., Szelei, J. and Tijssen, P. Multiple steps of the Porcine Parvovirus infectious cycle are involved in tropism control in bovine cell lines.

Des lignées cellulaires établies à partir d'une culture primaire de cellules bovines étaient diversement susceptibles à l'infection par les deux souches prototype du Parvovirus Porcin, NADL-2 et Kresse. Dans la première lignée cellulaire (D10), l'infection était bloquée au niveau des étapes précoces de l'infection et démontrait une très faible synthèse de la matrice de transcription. L'infection de la deuxième lignée cellulaire (G11) n'était productive qu'avec la souche NADL-2, tel qu'il avait été observé dans les cellules parentales. La réplication du génome était fortement réduite suite à l'infection par la souche Kresse, tandis que la distribution intracellulaire des protéines de la capsid était aberrante avec la souche NADL-2. La dernière lignée cellulaire bovine (F4) était pleinement permissive à l'infection par les deux souches de PPV bien que la réplication du génome et la productivité de l'infection étaient plus faible qu'observées dans les cellules porcines utilisées à des fins de comparaison. Ces résultats illustrent la nature fortement dépendante du tropisme des parvovirus sur les facteurs cellulaires et suggèrent que certains types de cellules des organismes non-hôtes peuvent supporter une infection permissive par les deux souches du virus.

**Multiple steps of the Porcine Parvovirus infectious cycle are involved in tropism control in bovine cell lines.**

Sandra Fernandes, Maude Boisvert, Jozsef Szelei and Peter Tijssen\*

INRS-Institut Armand Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

\*Corresponding author:

Peter Tijssen

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

531, boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Email: [peter.tijssen@iaf.inrs.ca](mailto:peter.tijssen@iaf.inrs.ca)

FAX: (450) 686-5627

Telephone: (450) 687-5010

## **Abstract**

Cell lines established from a semi-permissive primary culture of bovine cells were differentially sensitive to infection by the two prototype Porcine Parvovirus strains, NADL-2 and Kresse. In the first cell line (D10), infection was restricted early in the infectious cycle and severely impaired generation of the initial viral transcription template. Infection of the second cell line (G11) was only productive with the NADL-2 strain, as was observed in the parental cells. While genome replication was highly restricted with the Kresse strain, aberrant capsid protein localization was observed with NADL-2. The final cell line (F4) was permissive to both strains although genome replication and infectious virus production were lower than in the porcine cells used for comparison. These results highlight the dependant nature of parvovirus tropism on host factors and suggest that cells from a non-host origin can fully support a productive infection by both strains.

**Key words:** Tropism, Genome replication, Porcine Parvovirus

## Introduction

Porcine Parvovirus (PPV) belongs to the Parvovirus genus of the *Parvovirinae* subfamily, of the Parvoviridae family (Tattersall, 2006). These viruses have non-enveloped, icosahedral capsids of 25 nm in diameter and contain a nonsegmented single-stranded, linear DNA genome. Members of the Parvovirus genus are autonomous and most package only the DNA strand complementary to the viral mRNA (negative-polarity, 5kb genome), characterized by distinct terminal palindromic sequences and two main gene cassettes, for nonstructural (NS) and structural proteins (VP) (Tattersall, 2006).

The two promoters, in map positions 4 and 40, allow transcription of two major open reading frames and multiple overlapping smaller ORFs. The unspliced transcript from the P4 promoter generates the essential multifunctional NS1 protein (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993), which actively participates in transcription regulation (Rhode, 1985), genome replication (Rhode, 1989) and cytotoxicity (Anouja et al., 1997; Nuesch et Rommelaere, 2006). The second NS protein, NS2, has been shown to participate in late stages of viral replication in MVM (Choi et al., 2005), including assembly (Cotmore et al., 1997) and nuclear export of capsids (Eichwald et al., 2002; Miller et Pintel, 2002). Alternative splicing from the single P40 transcript directs synthesis of capsid proteins VP1 and VP2. A third structural protein, VP3, is generated by proteolytic cleavage of a short N-terminal region of VP2 during entry into the cells (Mani et al., 2006; Weichert et al., 1998). Our laboratory has recently identified another non-structural protein which is translated in a different frame, seven nucleotides downstream of the initiation codon of the VP2 (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005). The small protein, termed SAT (small alternatively translated protein), is found in all members of the *Parvovirus* genus and in other members of *Parvovirinae* subfamily (Szelei et al., 2010). Although the function of this late protein is unknown, knock-out mutations targetting this protein led to impaired replication that could be restored in complementation assays. The SAT protein has been localized in the endoplasmic reticulum and has been proposed to play a role in cytotoxicity by inducing ER-stress responses in infected cells.

The T=1 symmetry capsid of PPV is composed of 60 subunits of either VP2, with 579 amino acids, or VP1, which contains VP2 with a 150 amino acid N-terminal extension, in a 10:1 ratio (Weichert et al., 1998). The unique N-terminal region of VP1 encodes a phospholipase A2 (PLA2) motif (Zadori et al., 2001) and nuclear localization signals (Vihinen-Ranta et al., 2002) which are necessary for escape from the endosomal pathway (Farr, Zhang, et Tattersall, 2005) and nuclear targeting of the incoming virions (Lombardo et al., 2002), respectively.

Once in the nucleus, conversion of the incoming single-stranded genome to the monomeric replication form (mRF, double-stranded one genome in length) takes place in early S phase, and requires the cellular DNA polymerase  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) and its associated factors PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) and RPA (Replication protein A) (Bashir et al., 2000; Christensen et Tattersall, 2002). Transcription from the P4 promoter generates NS1, which trans-activates the VP promoter (P40) (Rhode, 1985) and the VP proteins are transported to the nucleus where capsid assembly takes place (Lombardo et al., 2000). The NS1 protein concurrently activates genome replication (Rhode, 1989), which proceeds by a mechanism similar to the rolling-circle replication of prokaryotes (Tattersall et Ward, 1976). Parvovirus DNA replication thus generates genome concatemers of varying lengths, including the dimeric replicative form (dRF, double-stranded two genomes in length) from which the single-stranded genomes are excised and packaged into pre-formed capsids (Cotmore et Tattersall, 2005a). Finally, the full virions are exported from the nucleus in a process involving NS2 (Eichwald et al., 2002; Engelsma et al., 2008; Miller et Pintel, 2002) while the rest of the virus is released following cell lysis induced by the cytotoxic activities of the NS proteins (Anouja et al., 1997; Nuesch et al., 2009).

PPV was identified many years ago as a cause of reproduction failure in swine (Rodeffer et al., 1975), yet little is known about the mechanisms that control its tropism both *in vivo* and *in vitro*. In other species of the Parvovirus genus, studies have shown that tropism was primarily determined at the cell surface. The evolution of the host-range of the feline parvovirus strains, such as canine parvovirus (CPV) and feline panleukopenia virus (FPV), involved interaction between the viral capsid and the transferrin receptor type 1 (TfR) (Hoelzer et Parrish, 2010; Hoelzer et al., 2008; Truyen et al., 1995). Alternatively, for other



members of the same genus, such as PPV and MVM, the virus may bind and enter many cell types regardless of their capacity to support a fully productive infection (Ridpath et Mengeling, 1988; Spalholz et Tattersall, 1983). In MVM, capsid residues were shown to be partially responsible for the phenotypes of the fibrotropic (prototypic) or lymphotropic strains, yet they do not involve attachment at the cell surface (Ball-Goodrich et Tattersall, 1992; Gardiner et Tattersall, 1988a). Depending on the cell type, restrictions have been identified at delivery of the incoming genome to the nucleus (Previsani et al., 1997), activation of the early promoter (Deleu et al., 1999) and genome replication and post-encapsidation steps (Rubio, Guerra, et Almendral, 2001). Previous studies of PPV infection of MDCK cells demonstrated that viral genome replication and transcription are both factors limiting their permissivity (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1992). Others identified a variant of the non-pathogenic attenuated NADL-2 vaccine strain, designated P2, which had gained the ability to replicate in canine cells after only two amino acid substitutions: one in the NS gene and one in the capsid gene (Vasudevacharya et Compans, 1992). Our previous studies demonstrated that a primary bovine testis cell culture (TV cells) was only sensitive to the NADL-2 strain of PPV, while infection with the highly pathogenic Kresse strain, isolated from skin lesions of an infected pig, was nonproductive (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Comparison of the complete genome sequences between these strains identified 13 nucleotide substitutions scattered throughout the protein coding regions, only 6 of which altered the VP protein sequence, and a 127-nucleotide repeated sequence downstream of the VP gene cassette. Furthermore, a short *Bgl*II restriction fragment encoding three of the non-synonymous substitutions between the strains was responsible for restricting Kresse replication in the TV cells and was thus termed to be the allotropic determinant.

To extend our comprehension of the mechanisms involved in this differential tropism, cell lines were established from the primary TV cells. This report focuses on the comparison of multiple steps of the virus replication cycle in a representative subset of the established bovine cell lines. We demonstrate the highly dependent nature of parvovirus tropism on cellular factors that interact at different levels of virus life cycle. Indeed, only a few differences within the genomes of these two viral strains can endow them with distinct replication requirements throughout their life cycle.

## Results

### Establishment of the bovine cell lines and sensitivity to infection with NADL-2 and Kresse viruses

Site-directed mutagenesis demonstrated that the S436P mutation of VP2, found in the BgIII allotropic determinant, was not necessary for the phenotype change in primary TV cells since it could be achieved by the tandem D378G and H383Q mutations. To further study the restrictive steps to PPV infection, bovine testis cell lines were established from the primary TV cells (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996) in which the allotropic determinant was identified, by stable transfection with a SV40 large T-antigen expressing plasmid. The thirteen resulting cell lines were maintained for at least ten passages and characterized regarding their stability, morphology and sensitivity to the two PPV strains (data not shown). Three bovine cell lines, D10, F4, and G11, were chosen for further studies since they represented the full spectrum of observed phenotypes to viral infection. The sensitivity of the cell lines were compared by development of cytopathic effects (CPE) after infection at different MOIs (Table 1). The permissive PT (porcine testis) cell line (a clone of ST cells, ATCC CRL-1746), used for culture and amplification of PPV viruses, was included as a comparison.

Since some viral replication may take place despite the low CPE, the capacity of these cell lines to support a productive infection was evaluated by titration of the culture supernatants by immunofluorescence at times when the mock-infected cells reached confluence. The quantity of infectious virus was expressed relative to the cells initially seeded (Fluorescent Foci forming units per cell, FFU/cell) (Fig. 1 A, B). PT was the most productive cell line with both viral strains regardless of the MOI used for infection. Infection of F4 cells was also productive with both strains, albeit at a 1 to 1.5 log-fold lower level than observed in the porcine cells. The G11 cell line showed a similar phenotype to F4 when infected by the NADL-2 strain while infection with the Kresse strain was non-productive, as had been observed in the parental TV cells. Finally, the D10 cell line failed to release any infectious virus, regardless of the infecting strain or the MOI used for its infection. Interestingly, bovine cells seemed to require higher MOIs than PT cells for optimal production, indicating that fewer of the initial cells were infected allowing more expansion of the cells and more substrate for infection (cf Fig. 1 and Table 1). The F4 cell line was thus

termed permissive to PPV infection, while D10 was deemed to be restrictive to the virus. G11 was permissive to NADL-2 but not to the Kresse strain.

### **Cell line growth rates**

Parvoviruses absolutely require actively dividing cells for their replication (Tattersall, 1972). Cell-cycle progression in the bovine cell lines was monitored by incorporation of a nucleotide analog (Edu) into replicating DNA. As shown in Fig. 1C, pulse-labeling of the cells for 1 h at 24 h post-plating (light bars) indicated that 40-50% of cells were actively replicating cellular DNA. When cells were labeled from 24 to 48 h after seeding, 80% of cells from each cell line was or had been in S phase, as determined by the percentage of total cells that had incorporated the nucleotide analog (Fig. 1C, dark bars). These results indicated that the low virus replication observed in the bovine cell lines was not due to the cells being in a resting or growth-arrested state.

### **Virus uptake at the cell surface**

The uptake of both PPV viruses by the cell lines was assessed following inoculation of plated cells at an MOI of 5 FFU. At 2 h and 4 h post-infection (p.i.) at 37°C, the cells were extensively washed and lysed. After removal of cellular debris by centrifugation, the lysates containing the intracellular virus were resuspended in cell culture medium and titrated by immunofluorescence (IF) on PT cells. No significant differences were observed in the ability of the virus to enter the PT and bovine cell lines regardless of the viral strain, although more virus had been taken up at 4 h p.i. than at 2 h p.i (Fig. 1 D and E, NADL-2 and Kresse, respectively). This indicated that uptake at the cell surface is not a major factor involved in PPV tropism.

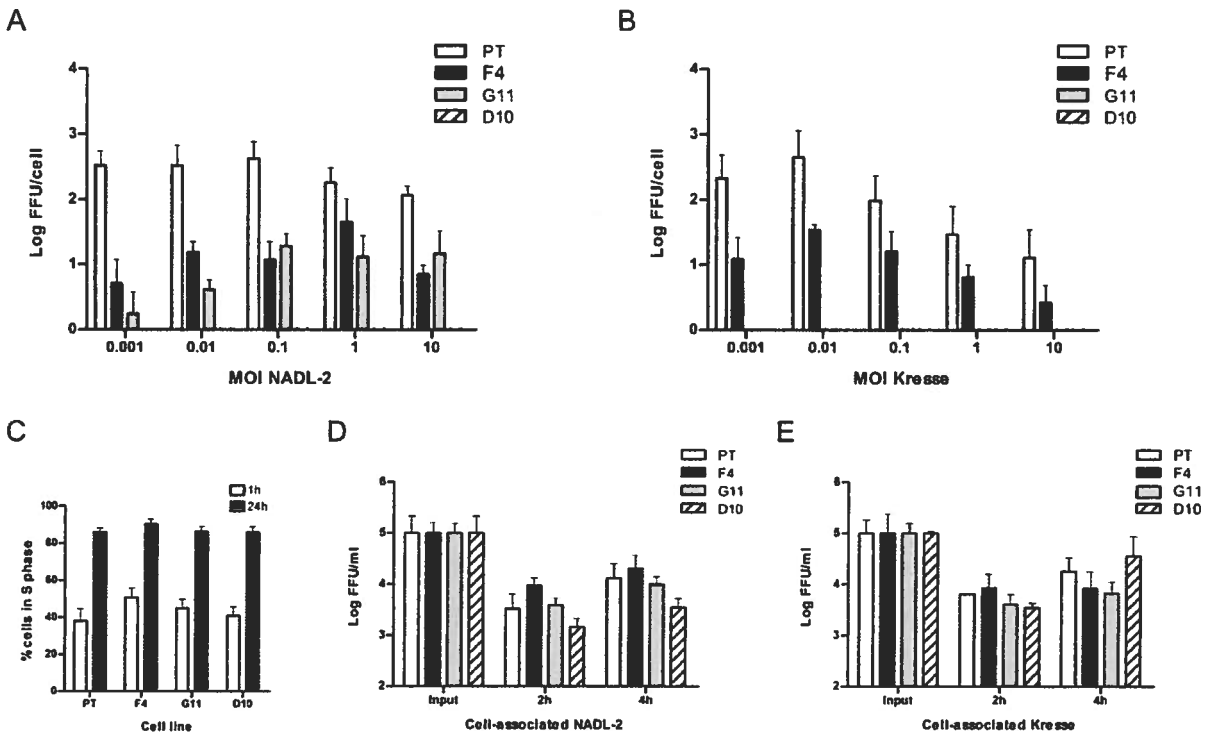
NADL-2												
MOI	PT			F4			G11			D10		
	20%	50%	100%	20%	50%	100%	20%	50%	100%	20%	50%	100%
0,001	-	-	++++	-	-	+	-	-	-	-	-	-
0,01	-	++++	++++	-	-	++	-	-	+	-	-	-
0,1	-	++++	++++	-	++	+++	-	+	+	-	-	-
1	+	++++	++++	-	++++	++++	-	+	+++	-	-	+
10	++++	++++	++++	+	++++	++++	-	++	+++	-	-	+

Kresse												
MOI	PT			F4			G11			D10		
	20%	50%	100%	20%	50%	100%	20%	50%	100%	20%	50%	100%
0,001	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,01	-	+	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
0,1	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	-	-
1	-	+++	++++	-	++++	++++	-	-	-	-	-	-
10	-	++++	++++	-	++++	++++	-	+	+	-	-	+

**Table 1. CPE developed throughout infection by PPV NADL-2 or Kresse strains on porcine (PT) and bovine cell lines (F4, G11, D10).**

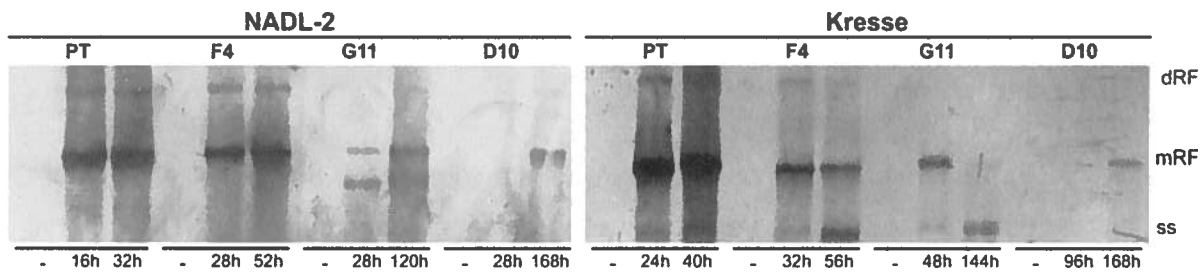
Cells seeded at 10% confluency were infected at indicated MOIs and scored daily for appearance of CPE (cell rounding, stretching and lysis) compared to mock-infected cells (Mock). Degree of CPE is shown for confluency of 20, 50 and 100%. Results are representative of at least 3 independent experiments. - : less than 10% CPE, + : 10-40% CPE, ++ :40-60% CPE, +++ :60-80 % CPE , +++++ : more than 80% CPE.



**Fig. 1. Sensitivity of bovine (F4, G11, D10) and porcine (PT) cell lines to infection by PPV strains. A.B. Infectious virus released after infection with NADL-2 (A) or Kresse (B) strains of PPV at different MOIs.** Cells were seeded at 10% confluency and infected at indicated MOIs with either viral strain. When mock-infected cells reached confluence, cell culture supernatants were harvested and titrated by immunofluorescence on PT cells. The measured infectious virus titers (in FFU/ml) were divided by the number of cells initially seeded for each cell line and are expressed as (Mean + SD) Log FFU/cell from at least 3 independent experiments. **C. Cell cycle progression.** Actively replicating cellular DNA was pulse-labeled with Edu for 1h (white bars) or 24h (black bars) and detected with Click-It Alexa488 Cell proliferation Assay (Invitrogen). (Mean + SD) percentage of cell in S phase (% Edu-labelled/total cells) was determined for at least 300 total cells in duplicate wells in 3 independent experiments. **D. E. NADL-2 (D) and Kresse (E) strain internalization.** Cells were infected at an MOI of 5 FFU (Input) and incubated at 37°C for 2h or 4h. At indicated times p.i., cells were extensively washed and lysed. Cleared lysates were resuspended in a final volume of 1 ml of complete medium and infectious virus was titrated by immunofluorescence on PT cells. Results are expressed in (Mean +SD) Log FFU/ml from duplicate wells in 3 independent experiments. No virus was detected in mock-infected cells (data not shown).

## **Generation of genomic replication intermediates**

Conversion of the single-stranded incoming parvovirus genome to mRF is a primordial step in the replication cycle, as it precedes viral transcription and depends entirely on cellular factors (Bashir et al., 2000; Cossons, Faust, et Zannis-Hadjopoulos, 1996). Synthesis of the different viral genome replicative forms was monitored in infected cells by Southern blotting. As shown in Fig. 2, the mRF was observed in extracts from all cell lines, although lower amounts were detected in the bovine cell lines. The dRF, generated by the "rolling hairpin replication" of parvoviruses, was very limited in D10 cells and G11 infected with the Kresse strain, consistent with the lack of replication observed by qPCR. Finally, although the amount of dRF was also low in NADL-2-infected G11 cells, the background level was high, likely due to the presence of replication intermediates of varying lengths. This suggested that unwinding and duplication of the NADL-2 genome was not as efficient in G11 cells and would correspond to a limiting step in PPV replication.

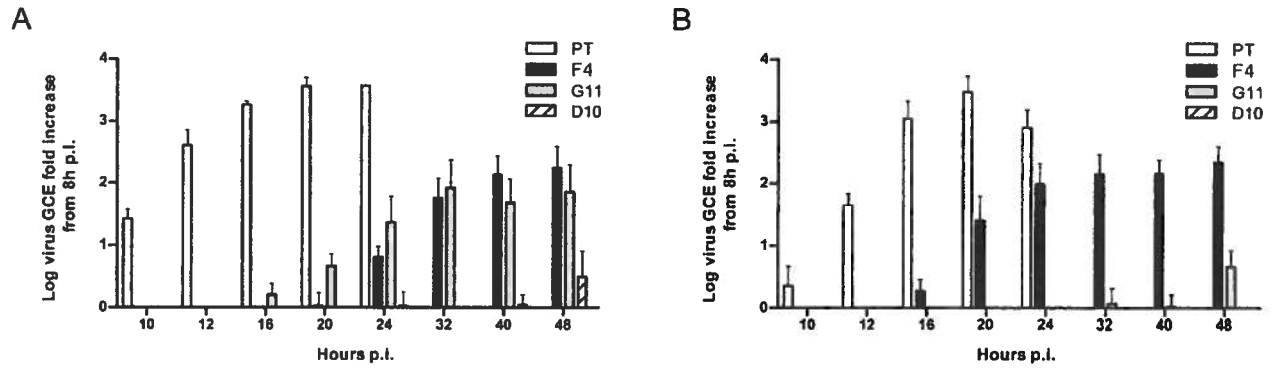


**Fig. 2. Synthesis of viral genome replication intermediates in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 or Kresse at an MOI of 5 FFU.** Southern blotting to detect viral genomic forms was performed on total DNA extracted from equal cell numbers at indicated times p.i. Results are representative of at least 3 independent experiments. ss: single-stranded genome, mRF: monomer replicative form (transcription template), dRF: dimer replicative form.

## Virus genome replication

PPV genome replication efficiency was monitored in the bovine cell lines by qPCR at different times p.i.. Results were expressed in genome copy equivalents (GCE) normalized to input virus after entry, but prior to replication, *i.e.* from 8 h p.i.. As shown in Fig. 3, virus genome replication in PT cells was readily detected from 10 h p.i. and reached a peak at 20 h p.i.. To avoid detection of viral DNA from second round replication, the PT cells were not monitored after 24 h. The NADL-2 genome replication was detected earlier in PT cells (10 h vs. 12 h) and to slightly higher levels than for the Kresse strain, indicating that even in this host-cell line, slight differences exist in genome replication efficiency between the two viral strains (Fernandes et al., submitted for publication). Genome replication from the NADL-2 strain in the permissive bovine cell lines (F4 and G11) was delayed compared to PT cells, starting at 16 h to 20 h and reaching a peak only at 40 h to 48 h. Second round viral DNA replication was also seen in the F4 cell line at 60-72 h p.i. (data not shown). In F4 cells, genome replication was equivalent between both PPV strains at a 1 log lower level than observed in Kresse-infected PT cells. The G11 cells supported NADL-2 genome replication at levels comparable to F4 cells, while no significant replication of the Kresse strain was observed, even when monitored up to 72 h p.i. (data not shown). Therefore, a major restriction point to Kresse replication in the G11 cell line was during the early steps of the infectious cycle. No significant difference was observed in the amount of viral genome copies per cell at 8 h p.i. between G11 and F4 infected with either strain, indicating that the virus was not simply recycled back to the cell surface after uptake (data not shown). Finally, the restrictive D10 cell line failed to mount any significant viral genome replication with either strain, the DNA level remaining virtually unchanged at all time points, up to 168 h (data not shown). This indicated that early steps in the infectious cycle are also involved in restricting PPV replication in the D10 cell line.

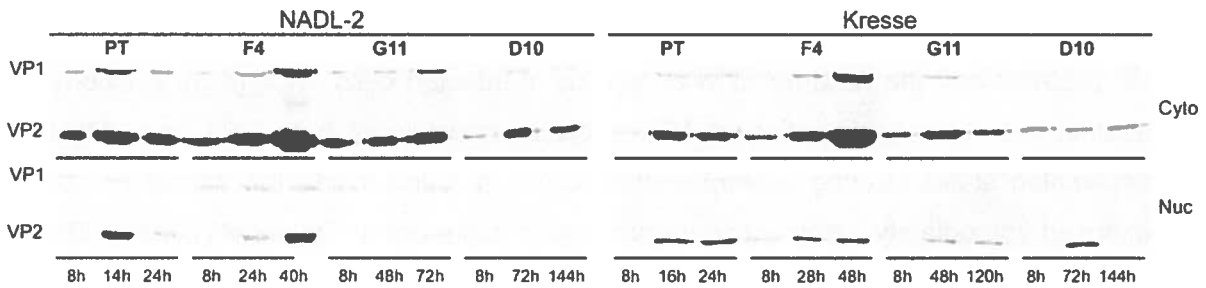




**Fig. 3. Viral DNA replication kinetics in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 (A) or Kresse (B) at an MOI of 5 FFU.** Increase in viral GCE at indicated times p.i. was expressed as relative to initial virus DNA measured at 8 h p.i. by qPCR and normalized to cell numbers with *c-myc* DNA. Results are expressed in (Mean +SD) Log GCE/ml from at least 3 independent experiments. Only time-points p.i. corresponding to a single viral replication cycle are shown.

## VP synthesis

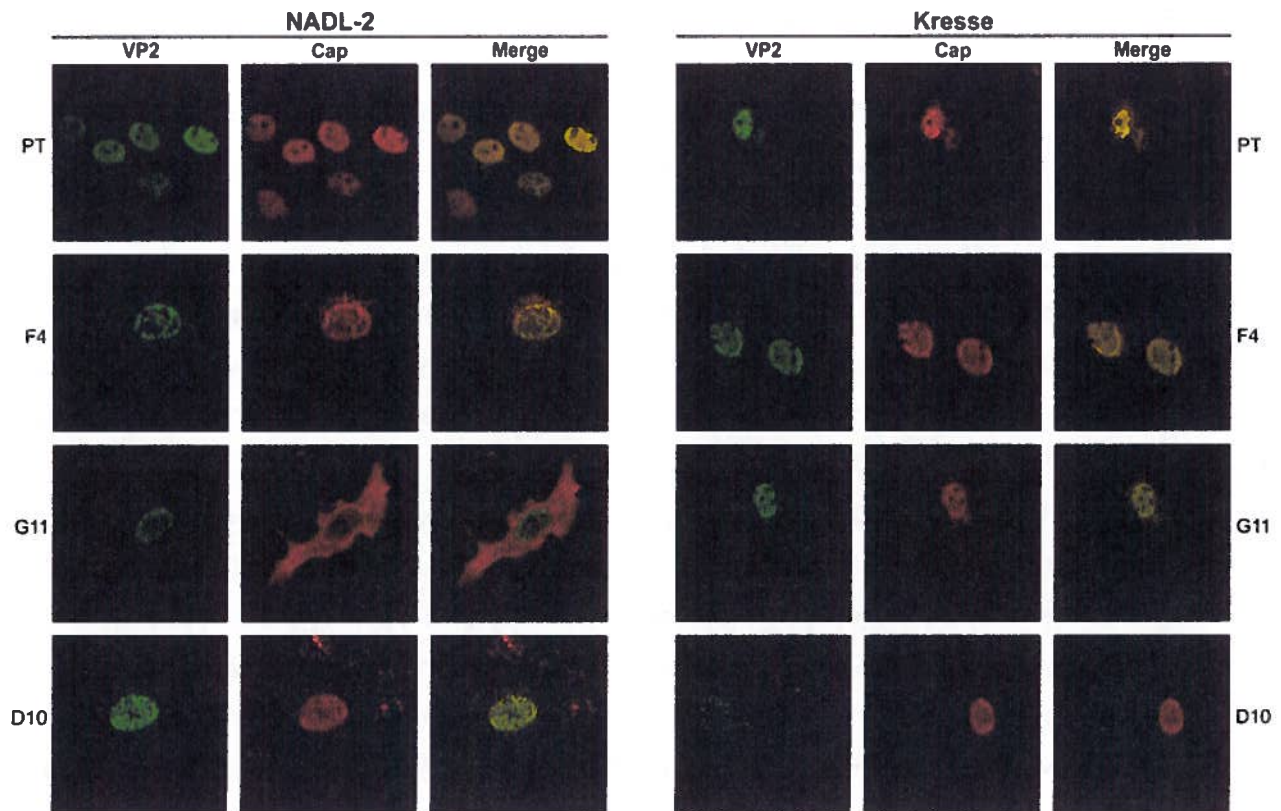
Cell fractionation of infected cell lysates and Western blotting were used to compare accumulation of VP proteins in the cytoplasmic and nuclear compartments. Both structural proteins were detected in all cell lines at different times p.i. when infected with either strain (Fig. 4), although the level of protein synthesis was lower in G11 and D10 cells. This indicated that the low amount of transcription template observed by Southern blotting was sufficient to support some structural protein synthesis, even when the cell line failed to release detectable amounts of infectious virus. The distribution of proteins between sub-cellular compartments was similar in F4 and PT cells, yet the total amount of protein was slightly higher in the bovine cell line. This could be a consequence of the delayed CPE in F4 cells (Table 1). Furthermore, while VP protein synthesis was lower in G11 cells, the proportion of structural proteins in the cytoplasmic fraction from NADL-2 infected G11 cells seemed higher than observed in PT or F4 cells (Fig. 4, top and bottom panels). In contrast, cytoplasmic accumulation was not observed in Kresse infected G11 cells, suggesting that differences within the VP proteins, or VP gene elements, may be responsible for these effects. In D10 cells, protein synthesis was barely above the input level virus. In view of these results, the distribution of VPs and capsids was further analyzed by immunofluorescence and confocal microscopy.



**Fig 4. Distribution of VP proteins in cytoplasmic and nuclear fractions from porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 or Kresse at an MOI of 5 FFU.** Infected cells were harvested at indicated times p.i. and fractionated into crude cytoplasmic (top panels) and nuclear lysates (bottom panels). Proteins from equivalent cell numbers were separated by SDS-PAGE and Western blotting was performed using an antibody to the N-terminal region of VP2 thus detecting the VP1 and VP2 proteins. Quality of extractions was assessed by probing fractions with anti-Rab5 and anti-LaminA antibodies (data not shown).

## Structural protein distribution in infected cells

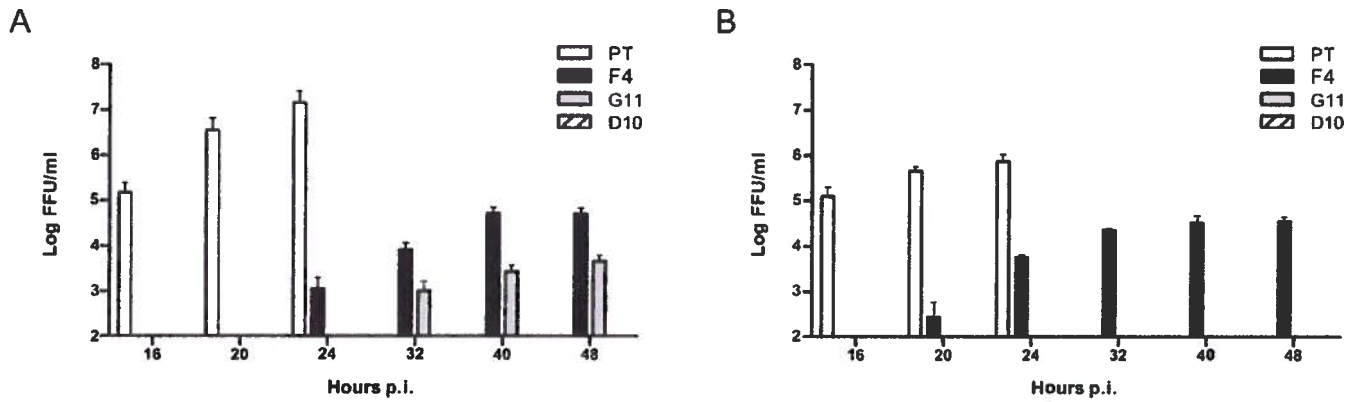
Double-labeling indirect immunofluorescence was performed to separately detect the VP proteins and the assembled viral capsids in infected cells (MOI of 5). Antibody raised against the N-terminal portion of VP2 allowed detection of both VP1 and VP2 in non-assembled states. During assembly, this region is found inside the capsid but becomes exposed immediately before genome packaging (Cotmore et Tattersall, 2005a). Therefore, this antibody detects only pre-capsid precursors and full capsids (unpublished observations). Alternatively, monoclonal antibody 3C9, which recognizes a structural epitope, binds to both full and empty capsids. Confocal microscopy imaging indicated that infection of the permissive PT and F4 cells with either strain led to nuclear accumulation of full capsids, as observed by extensive co-localization of both antibodies (Fig. 5). Very few cells were positive for only VP2 or only capsids at all times p.i. (data not shown), indicating that VP translocation to the nucleus, capsid assembly and genome packaging presumably occurred rapidly and concurrently during infection. In D10 cells infected with either PPV strain, co-localization of both antibodies was also observed although the proportion of total positive cells was very low ( $\leq 0.01\%$ , data not shown), in agreement with the lesser amount of transcription template and genome replication (Fig. 2 and 3, respectively). As observed in the D10 cell line, only a fraction of the G11 cells displayed viral antigens ( $\leq 1\%$  and  $\leq 0.1\%$ , with the NADL-2 and Kresse strains, respectively). While about 80% of infected G11 cells displayed a normal phenotype, some NADL-2-infected cells displayed an alternate localization of the structural proteins. Co-localization of capsid and VP2 staining in the nucleus was weak, while cytoplasmic accumulation of capsids was evident. It is unclear however if this resulted from aberrant cytoplasmic capsid assembly, or from accumulation of DNA-containing capsids in the cytoplasm late in infection.



**Fig 5. Distribution of capsids and VP2 proteins in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 or Kresse at an MOI of 5 FFU.** Indirect immunofluorescence and confocal microscopy imaging was performed using an antibody to the N-terminal region of VP2 (with anti-rabbit Alexa488, left panels: VP2) to detect pre-capsid precursors and full capsids and with monoclonal antibody 3C9 (with anti-mouse Alexa568, center panels: Cap) to detect full and empty capsids. Perfect co-localization of VP2 and Cap staining (yellow) is indicative of full capsid (right panels: Merge).

## Infectious virus production

The release of infectious virus was monitored by titration of the culture supernatants harvested at different times p.i. (Fig. 6 A and B for NADL-2 and Kresse, respectively). For each infection, the background virus measured in the supernatant at 12 h p.i. was lower than the detection level in this assay ( $10^2$  FFU/ml). Virus production was highest in the PT cell line though the infectious titers differed by over 1.5 logs between the strains. Since the final genome copy number increase was equivalent in PT cells when infected with either NADL-2 or Kresse, the efficiency of late steps of the infectious cycle, such as packaging and release, would be the restrictive step of Kresse replication in the host cell line (Fernandes et al., submitted for publication). This strain-specific difference was not observed in the F4 cells, suggesting that mechanisms involved in the late stages of viral replication may differ between cell lines. Infection of the G11 cell line with the NADL-2 strain lead to a 1 log lower virus production compared to F4 cells, likely resulting from the lower amount of dRF in this cell line. Infection of G11 cells with the Kresse strain resulted in a slight production of infectious virus at 60 h p.i. ( $4 \times 10^2$  FFU/ml, data not shown) suggesting the slight increase in genome copy numbers observed at 48 h (Fig. 2B) resulted in a productive infection. As expected, no infectious virus was released from D10 cells regardless of the strain used for infection even when production was monitored up to 168 h (data not shown).



**Fig 6. Kinetics of infectious virus released in porcine (PT) and bovine (F4, G11, D10) cell lines after infection with NADL-2 (A) or Kresse (B) at an MOI of 5 FFU.** Supernatants were harvested at indicated times p.i. and titrated by immunofluorescence on PT cells. Results are expressed as (mean + SD) Log FFU/ml, from at least 3 independent experiments.

## Discussion

PPV tropism has been difficult to study *in vitro* since few cell lines have been identified that fully support a productive infection (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). In this report, we characterized three bovine testis cell lines established from a semi-permissive primary culture that varied greatly in their phenotype toward PPV infection. Both viral strains were efficiently taken up by all cell lines, indicating that receptor utilization is not an essential tropism determinant, as had been observed in canine cell lines (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1992; Ridpath et Mengeling, 1988). While most parvoviruses are thought to utilize classic receptor-mediated endocytosis pathways to enter the cells (Hansen, Qing, et Srivastava, 2001; Mani et al., 2006; Parker et Parrish, 2000), recent studies in our laboratory have demonstrated that a process resembling macropinocytosis is also highly important for PPV uptake (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). No primary receptor has been identified for PPV, yet binding to sialic acid on the cell surface is essential in both PT (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010) and the bovine cell lines (data not shown). Attachment to the sugar moieties at the cell surface may be sufficient for non-specific uptake and provides a mechanistic explanation as to how parvoviruses may bind and enter cells, regardless of their capacity to support infection.

The primary level of restriction observed in the non-permissive cell lines (D10 with both strains) was generation of the transcription template mRF and early genome replication (Fig. 2 and 3). It remains unclear whether this resulted from lower nuclear delivery of the virus or from reduced conversion of the incoming genome to the double-stranded intermediate. However, nuclear targeting of parvovirus virions during entry is known to be an inefficient process even in fully permissive cells, and proceeds by mechanisms which have yet to be fully elucidated (Harbison, Chiorini, et Parrish, 2008; Mani et al., 2006; Parrish, 2010). Low expression of Pol  $\delta$  associated factors could explain reduced conversion of the incoming virus DNA in the D10 cells, since these cellular components are known participants in the initial replication of the parvovirus genome. Increased expression of PCNA in certain cervical cancer isolates has been shown to enhance DNA replication of the parvovirus Adeno-Associated Virus (AAV) (Kang et al., 2009), suggesting that the expression level of these factors can alter parvovirus permissivity.

A secondary level of restriction was the cytoplasmic accumulation of capsids in the semi-permissive cells (Fig. 5, G11 cells with NADL-2 strain). Cytoplasmic capsid assembly



of parvovirus VP proteins was not observed with permissive cells, but is known to occur in insect cells (Gilbert et al., 2005; Yuan et Parrish, 2001) and has been proposed to result from reduced nuclear transport of capsid sub-units. Recent studies have indicated that Raf-1 specific phosphorylation of MVM capsid-assembly intermediates is required for nuclear import prior to assembly (Riolobos et al., 2010). Since the activation of components of the MAPK signaling cascade, including Ras/Raf/MEK/ERK, can be altered in transformed cells, it has been proposed as a factor affecting permissivity to parvovirus infection. Whether reduced nuclear transport of NADL-2 VPs in G11 cells is responsible for cytoplasmic capsid assembly is presently undetermined.

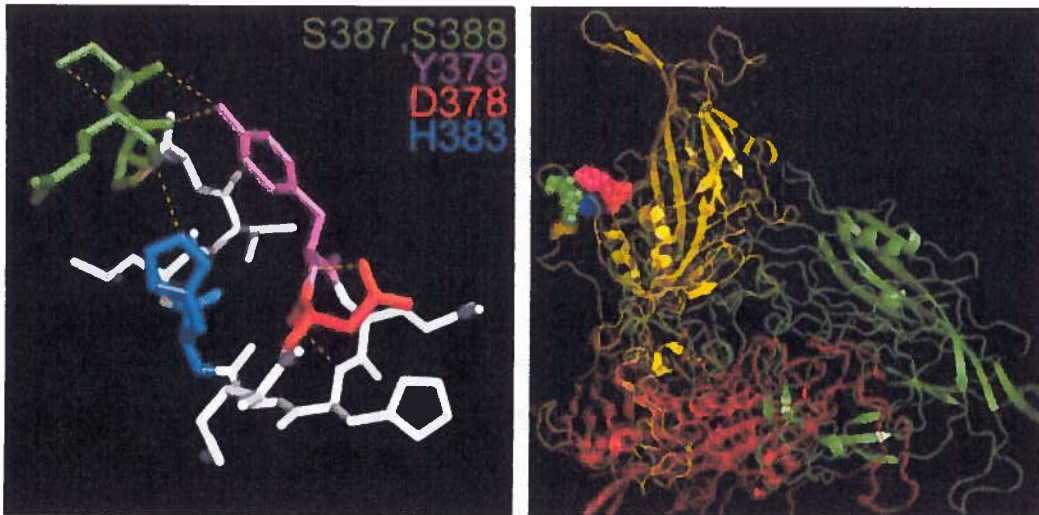
Alternatively, this phenotype may result from accumulation of full-capsids in the cytoplasm late in infection. During MVM infection, the NS2 protein interacts with CRM1, a member of the importin/karyopherin family of nuclear transport proteins, and regulates export of capsids before the bulk of infectious particles are released through virus-induced cell lysis (Eichwald et al., 2002; Engelsma et al., 2008; Miller et Pintel, 2002). Since lysis does not occur efficiently in the G11 cell line (Table 1), it would be conceivable that nuclear export of capsids would result in cytoplasmic accumulation of virions late in infection. In either case, these results suggest that assembly/packaging/export co-factors interact differently with the structural proteins of both viral strains, since capsid assembly seemed normal when G11 cells were infected with Kresse. These interactions would most likely occur within the allotropic determinant since it encodes three of the five coding differences in the VP2 gene (H378Q, D378G, and S436P in NADL-2 and Kresse, respectively) and this fragment was shown to be sufficient to restore Kresse replication in the parental TV cells (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Interestingly, site-directed mutagenesis indicated that the serine to proline change at residue 436 failed to have an impact on the phenotype to infection in primary TV cells. Although its position near the 3-fold axis on the capsid surface would seem to be in a highly accessible position, the non-conservative change may not alter the surface configuration as had previously been assumed (Simpson *et al.*, 2002). Indeed, the hydroxyl ion from the serine side chain may easily link its backbone amino group, thus creating a ring-like structure similar to the proline residue. The other two residues of the allotropic determinant map to opposing sides of loop 3 just below the capsid surface. The glycine found in the Kresse strain at VP2 position 383 (D378G) could be easily accommodated due to its small size. On the contrary, the residue change at VP2 position 378 (H to Q) is much less conservative. The larger histidine would be positively charged in

the intracellular milieu while glutamate is smaller and uncharged. Both these residues may interact with Ser387, Ser388 and Tyr379 on the cell surface altering their accessibility and favoring interaction of one strain with cellular counterparts (Fig. 7).

Finally, our results highlighted the great dependence of PPV on cellular factors throughout the course of its replication cycle. Indeed, the restrictive bovine cell lines showed replication deficiencies early in the infectious cycle, while final genome amplification and infectious virus production were slightly lower in the most permissive bovine cell line than in porcine cells. Furthermore, the lower productivity of Kresse infection observed in PT cells was not seen in the F4 cell line. This is particularly interesting since NADL-2 is a porcine cell line adapted strain that is attenuated *in vivo*, and has been used for vaccination. Kresse replication may reflect natural infection more readily, suggesting that some non-host species cells may fully support replication of both pathogenic and non-pathogenic PPV strains.

## **Acknowledgements**

The authors wish to thank Marcel Desrosiers for technical expertise with the confocal microscopy imaging, Dr. Mohamed Laakel for help in establishing the bovine cell lines, and Dr. Zoltan Zadori for helpful discussions. This research was funded in part by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC) to P.T. and the Fondation Armand-Frappier for scholarships to S.F. and M.B.



**Fig 7. Molecular modeling of residues on the capsid surface proposed to interact with critical residues (D378G and H383Q) from the allotropic determinant.** Residues D378 (red) and H383 (blue) from NADL-2 VP2 are thought to interact with conserved residues S387 and S388 (green) and Y379 (purple) on the surface of the capsid (left panel). The substitutions D378G and H383Q in the Kresse strain may alter interactions with cellular factors during the infection. The residues shown are located on loop 3, near the edges of the trimer capsid assembly sub-unit composed of 3 highly intertwined VP2 proteins (yellow, green and red, right panel). Images were generated using PyMol software and the 1K3V PDB file for the PPV capsid monomer.

## **Materials and Methods**

### **Cell lines and viral strains**

PT cells, a clone of ST cells (ATCC CRL-1746), were obtained as previously described (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993) and maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 6.5% FBS (Wisent), and 2 mM L-glutamine (Invitrogen). The original primary testis TV cells (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996) were stably transfected with plasmid SV3-neo expressing SV40 Large T-antigen and selected with neomycin (G418, 0.4 mg/ml). Individual cell clones were selected twice by limiting dilution, under antibiotic selection and maintained in DMEM, supplemented as described for PT cells, with addition of 0.1 mM Non Essential Amino Acids (NEAA, Invitrogen) and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen). Among the 13 different bovine cell lines obtained, three representative cells lines (F4, G11, D10) were used for further studies and were stably maintained in the laboratory for at least 50 passages without any changes in morphology or phenotype to viral infection. NADL-2 PPV strain was purchased from ATCC (VR-742) and Kresse PPV strain was obtained as previously described (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Viral stocks were grown on PT cells and supernatants were used directly for infection after a brief centrifugation to remove cellular debris (20 min, 5,000×g). The absence of cross contamination of the virus stocks was verified by periodic sequencing.

### **Immunofluorescence and viral titers**

Indirect immunofluorescence (IF) was carried out as described previously (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). Titrations were performed on PT cells in 96-well plates. Briefly, at 20 h p.i., cells were fixed in 3% formaldehyde, permeabilized with 3% Triton X-100 and treated with monoclonal antibody 3C9-D11-H11 (ATCC CRL-1745, diluted 1:50) which binds to both full and empty capsids, followed by secondary antibody goat anti-mouse Alexa488 (diluted 1:2000, Invitrogen). Capsid-positive nuclei were counted in triplicate wells containing 20-200 fluorescent foci and titres of the inoculum were calculated as FFU/mL. For confocal imaging, cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates, infected at MOI of 5 FFU, were fixed at different times post-infection and permeabilized as described above. Monoclonal antibody 3C9 was used to detect capsids while anti-VP2 antibody (1:1500), generated by a N-terminal peptide immunization of rabbits (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005), was used to detect full capsids and VP1 and VP2 in non-assembled states. Secondary antibodies were goat anti-mouse Alexa Fluor™ 568 and goat anti-rabbit Alexa

Fluor™ 488 (both 1:2000, Invitrogen). All solutions were prepared in IF buffer (DPBS 1X, pH7.4 (Invitrogen), 0.1% BSA fraction V (Invitrogen), 0.001% Tween20, 0.02% sodium azide), and cells were extensively washed with DPBS after each step. Coverslips were mounted on glass slides with Fluor Preserve™ (Calbiochem). Images were collected on a Bio-Rad Radiance 2000 confocal system with an argon-krypton laser at 488 and 568 nm (diode, 638 nm) mounted on a Nikon E800 microscope using a 60x objective, with an aperture of 1.4, and a 1.6x software magnification in the Lasersharp software program (Bio-Rad).

### **Development of CPE after infection**

The degree of CPE developed in each cell line after infection by either strain at different MOIs was determined after seeding cells at low density in 6-well plates ( $3.5 \times 10^4$  cells/well for PT cells,  $5 \times 10^4$  cells/well for F4, G11 and D10 bovine cells). The cultures were visually scored for appearance of cell rounding or “ stretching ” and detachment from the bottom of the wells at different confluence levels of the mock-infected reference cells. Only actively growing cells are susceptible to parvovirus infection (Tattersall, 1972), therefore the degree of CPE was scored only until the mock-infected cells reached confluence. Results were compiled from duplicate wells, in at least four independent experiments.

### **Cell labelling with Edu for cell cycle analysis**

Cells were seeded on glass coverslips in 24-well plates to obtain 40-50% confluence after 24h incubation, at the start of labelling ( $5 \times 10^4$  cells/well for PT cells,  $3.5 \times 10^4$  cells/well for F4 and G11 cells and  $2 \times 10^4$  cells/well for D10 cells), and staining was performed with the Click-It Edu labelling system (Invitrogen). Edu incorporation was established both for one-hour pulses after 24 h of cell growth and over a 24 h period 24 h post plating. For pulse-labelling assays, coverslips were inverted on 15  $\mu$ l of complete medium supplemented with 10  $\mu$ M Edu, and incubated for 1h at 37°C in a humidified incubator under 5% CO<sub>2</sub>. Coverslips were then fixed for 30 min in 3% formaldehyde in IF buffer as described above. To determine the percentage of cells that underwent cell replication in S phase within 24h, cell medium was supplemented with 4.2  $\mu$ M Edu at 24 h post-plating and incubation was continued for an additional 24 h and fixed as above. After fixation, cells were washed in PBS and permeabilized for 30 min with 3% Triton-X100 in IF buffer. Following extensive washing, cells were labelled with the Click-IT Edu Alexa 488 Cell Proliferation Assay™ (Invitrogen)

according to the manufacturer's recommendations. Total cell DNA was then stained with Hoechst 33342 (2 µg/ml) for 30 min. Cells were mounted on glass slides with Fluor Preserve™ (Calbiochem) and counted under fluorescence microscope. In each assay, the ratio of Edu-Alexa Fluor™488 labelled cells to total cells (Hoechst) were scored from at least 300 total cells in duplicate slides, from at least 3 independent experiments. Results were expressed as mean + SEM percent of cells in S phase (Edu-Alexa Fluor™488 labelled/Hoechst labelled).

### **Virus uptake assays**

Cells were seeded in 24-well plates at  $5 \times 10^4$  cells/well. After a 16 h incubation to allow for cell attachment, cells were infected with either NADL-2 or Kresse viruses at an MOI of 5. At 2 h and 4 h p.i., cells were extensively washed with PBS and were harvested in 100 µl lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% CHAPS). The lysates were centrifuged to remove cell debris (15 min, 21,000×g, 4°C) and cleared lysates were diluted to a final volume of 1 ml in cell medium. Infectious virus in cleared lysates from mock or infected cells and aliquots of input virus were titrated by indirect immunofluorescence as described below.

### **Southern blotting**

Cells were seeded in duplicate wells of a 6-well plate ( $2 \times 10^5$  cells/well) and infected with either viral strain (MOI of 5 FFU). At 8h p.i., inocula were removed, cells were extensively washed in PBS and fresh medium was added. At each time point p.i., cells were harvested with trypsin and centrifuged 10 min at 21,000×g. The cell pellets were resuspended in 200 µl STE (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA), and frozen at -20°C until DNA was extracted by a modified Hirt protocol. Briefly, 800 µl of heated lysis buffer (0.75% SDS, 20 mM Tris pH 8.0, 1.25 M NaCl, 1 mM EDTA, 100 µg/ml Rnase A, 150 µg/ml proteinase K) was added to the samples and incubated at 37°C for 4h, then chilled to -20°C for at least 30 min. Samples were centrifuged 15 min at 21,000×g at 4°C. DNA was extracted from supernatants using one volume of Miniprep Express Matrix (MP Biomedicals) according to the manufacturer's instructions. Samples were resuspended in a final volume of 40 µl H<sub>2</sub>O. Total DNA extracted for each sample was loaded on a 0.8% agarose gel in 1xTAE (40 mM Tris, 5mM acetate, 1mM EDTA, pH 7.8) and electrophoresis was carried out at 80 V for 2.5 h. The DNA in the gel was depurinated, denatured and neutralized as described in Dig Application guide for Filter Hybridization (Roche Applied Science). The

DNA was then vacuum-transferred to positively-charged nylon membranes in 20xSSC (0.3 M sodium citrate, 3 M NaCl) for 2 h at 50 psi. Membranes were washed in 6xSSC for 5 min, air-dried for 20 min and DNA was fixed by UV-crosslinking. Membranes were then pre-hybridized in high-SDS hybridization buffer (50% formamide, 2% Blocking Buffer (Roche Applied Science), 5xSSC, 50 mM sodium phosphate pH 7.0, 1% N-lauryl-sarcosine) for 2 h at 50°C. A PCR fragment of the PPV NS coding region was labelled by random-priming with DIG-High-Prime according to the manufacturer's instructions (Roche Applied Science) and was hybridized to membranes as described in Dig Application guide for Filter Hybridization (Roche Applied Science). Following hybridization, blots were washed twice in low stringency buffer (2x SSC, 0.1% SDS) at room temperature and twice in high stringency buffer (0.1x SSC, 0.1% SDS at 65°C) to remove unbound probe. Detection of the probe was performed with monoclonal anti-DIG antibody as suggested by the manufacturer (Roche Applied Science) and alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse (AP) secondary antibody (1:1000, Bio-Rad Laboratories). Colorimetric detection was carried out with NBT/BCIP (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommendations. Blots shown are representative of at least three independent experiments.

### **Cell fractionation and Western blotting**

Cells were fractionated using a differential detergent lysis protocol adapted from (Andrews et Faller, 1991). Briefly,  $4 \times 10^5$  cells were harvested at different times p.i., scraped in ice-cold PBS and pelleted by quick centrifugation. The cell pellet was allowed to swell on ice for 10 min in a hypotonic buffer (10 mM Hepes-KOH pH 7.9, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1x complete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)) and vortexed for 10 sec. After brief centrifugation, the cytoplasmic fraction was collected and the pellet was resuspended in a hypertonic buffer (20 mM Hepes-KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 1x complete EDTA-Free Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science)) and allowed to sit on ice for 20 min. After a 2 min centrifugation at 15,000xg at 4°C, the nuclear fraction was collected and the pellet was discarded. Amounts corresponding to equivalent cells numbers from each fraction were separated by 7.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories) and western blotting was performed as described. Blots were probed with primary antibodies to VP2 (1:1000), anti- $\beta$ -tubulin and anti-LaminA (Sigma-Aldrich) and AP-conjugated secondary antibodies (goat anti-mouse and goat anti-rabbit, Bio-Rad Laboratories) according to the manufacturer's suggested conditions and colorimetric

detection was performed as described above. Blots shown are representative of at least three independent experiments.

### **qPCR**

DNA was extracted from infected cells by the modified Hirt extraction described above for Southern blotting. qPCR on PT cells was performed as described (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). For bovine cell normalization, bovine c-myc (GenBank AF519455) was cloned in pSmarHC-AmpR (GenBank AF399742) using forward primer 5'-CTTAAGCTTGAATCGGGGTCACCCTCT-3' and reverse primer 5'-CTGTCTAGAGTAGCTGTTCAAGTTTGAGTTTCAAC-3' between HindIII and XbaI sites. qPCR was performed with forward primer 5'-AGCGCCAGAGGAGAAACGAG-3' and reverse primer 5'-GTTTCAACTGTTCTCGCCTCTTCTG-3' and was linear in the range of 0.5 fg to 1 ng. Primer specificity was verified using BLAST analysis and melting curve analysis from 60°C to 95°C with a temperature increase at each stop of 1°C for 30 sec. Viral DNA was expressed in GCE as the increase after entry, but before replication, *i.e.* from the GCE measured at 8h p.i in each experiment. Results shown are Mean Fold Increase + SD (Log GCE) from at least 3 independent experiments.

### **Capsid protein modeling**

Residues in proximity to D378 and H383 in VP2 were illustrated with PyMol using the PDB 1K3V. Trimers were generated with oligomer generator utilities from the Viperdb web site (<http://viperdb.scripps.edu/>) and the proteins were accessed individually after introducing the coordinates of each protein in the line ENDMDL and a line MODEL 1, (or 2, 3) using the software editor ConTEXT.



## References

Andrews, N. C., and Faller, D. V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**(9), 2499.

Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S., and Caillet-Fauquet, P. (1997). The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* **71**(6), 4671-8.

Ball-Goodrich, L. J., and Tattersall, P. (1992). Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J Virol* **66**(6), 3415-23.

Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K. (2000). Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5522-7.

Bergeron, J., Hebert, B., and Tijssen, P. (1996). Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* **70**(4), 2508-15.

Bergeron, J., Menezes, J., and Tijssen, P. (1993). Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* **197**(1), 86-98.

Boisvert, M., Fernandes, S., and Tijssen, P. (2010). Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol* **84**(15), 7782-92.

Choi, E. Y., Newman, A. E., Burger, L., and Pintel, D. (2005). Replication of minute virus of mice DNA is critically dependent on accumulated levels of NS2. *J Virol* **79**(19), 12375-81.

Christensen, J., and Tattersall, P. (2002). Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J Virol* **76**(13), 6518-31.

Cossons, N., Faust, E. A., and Zannis-Hadjopoulos, M. (1996). DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome. *Virology* **216**(1), 258-64.

Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M., Jr., Carbonell, L. F., Bratton, J., and Tattersall, P. (1997). The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**(2), 267-80.

Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2005). Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes. *Virology* **336**(1), 100-12.

Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1999). Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* **73**(5), 3877-85.

Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J., and Salome, N. (2002). The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* **76**(20), 10307-19.

Engelsma, D., Valle, N., Fish, A., Salome, N., Almendral, J. M., and Fornerod, M. (2008). A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Mol Biol Cell* **19**(6), 2544-52.

Farr, G. A., Zhang, L. G., and Tattersall, P. (2005). Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47), 17148-53.

Gardiner, E. M., and Tattersall, P. (1988). Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J Virol* **62**(5), 1713-22.

Gilbert, L., Valilehto, O., Kirjavainen, S., Tikka, P. J., Mellett, M., Kapyta, P., Oker-Blom, C., and Vuento, M. (2005). Expression and subcellular targeting of canine parvovirus capsid proteins in baculovirus-transduced NLFK cells. *FEBS Lett* **579**(2), 385-92.

Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A. (2001). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* **75**(9), 4080-90.

Harbison, C. E., Chiorini, J. A., and Parrish, C. R. (2008). The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol* **16**(5), 208-14.

Hoelzer, K., and Parrish, C. R. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* **41**(6), 39.

Hoelzer, K., Shackelton, L. A., Parrish, C. R., and Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* **89**(Pt 9), 2280-9.

Kang, B. Y., You, H., Bandyopadhyay, S., Agrawal, N., Melchert, R. B., Basnakian, A. G., Liu, Y., and Hermonat, P. L. (2009). Cervical cancer isolate PT3, super-permissive for adeno-associated virus replication, over-expresses DNA polymerase delta, PCNA, RFC and RPA. *BMC Microbiol* **9**, 79.

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

Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J. M., Kempf, C., and Ros, C. (2006). Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* **80**(2), 1015-24.

Miller, C. L., and Pintel, D. J. (2002). Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J Virol* **76**(7), 3257-66.

Nuesch, J. P., Bar, S., Lachmann, S., and Rommelaere, J. (2009). Ezrin-radixin-moesin family proteins are involved in parvovirus replication and spreading. *J Virol* **83**(11), 5854-63.

Nuesch, J. P., and Rommelaere, J. (2006). NS1 interaction with CKII alpha: novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity. *J Virol* **80**(10), 4729-39.

Oraveerakul, K., Choi, C. S., and Molitor, T. W. (1992). Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J Virol* **66**(2), 715-22.

Parker, J. S., and Parrish, C. R. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74**(4), 1919-30.

Parrish, C. R. (2010). Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection. *Curr Top Microbiol Immunol*.

Previsani, N., Fontana, S., Hirt, B., and Beard, P. (1997). Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMp3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell-specific differences in virus uncoating in vitro. *J Virol* **71**(10), 7769-80.

Rhode, S. L., 3rd (1985). trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* **55**(3), 886-9.

Rhode, S. L., 3rd (1989). Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein. *J Virol* **63**(10), 4249-56.

Ridpath, J. F., and Mengeling, W. L. (1988). Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res* **10**(1), 17-27.

Riolobos, L., Valle, N., Hernando, E., Maroto, B., Kann, M., and Almendral, J. M. (2010). Viral oncolysis that targets Raf-1 signaling control of nuclear transport. *J Virol* **84**(4), 2090-9.

Rodeffer, H. E., Leman, A. D., Dunne, H. W., Cropper, M., and Sprecher, D. J. (1975). Reproductive failure in swine associated with maternal seroconversion for porcine parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* **166**(10), 991-2.

Rubio, M. P., Guerra, S., and Almendral, J. M. (2001). Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J Virol* **75**(23), 11573-82.

Simpson, A. A., Hebert, B., Sullivan, G. M., Parrish, C. R., Zadori, Z., Tijssen, P., and Rossmann, M. G. (2002). The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol* **315**(5), 1189-98.

Spalholz, B. A., and Tattersall, P. (1983). Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* **46**(3), 937-43.

Szelei, J., Liu, K., Li, Y., Fernandes, S., and Tijssen, P. (2010). Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerg Infect Dis* **16**(3), 561-4.

Tattersall, P. (1972). Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J Virol* **10**(4), 586-90.

Tattersall, P. (2006). The evolution of parvovirus taxonomy. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 5-14. Hodder Arnold, London, UK.

Tattersall, P., and Ward, D. C. (1976). Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**(5573), 106-9.

Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S. F., Obermaier, B., Veijalainen, P., and Parrish, C. R. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol* **69**(8), 4702-10.

Vasudevacharya, J., and Compans, R. W. (1992). The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology* **187**(2), 515-24.

Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W. S., and Parrish, C. R. (2002). The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* **76**(4), 1884-91.

Weichert, W. S., Parker, J. S., Wahid, A. T., Chang, S. F., Meier, E., and Parrish, C. R. (1998). Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology* **250**(1), 106-17.

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

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

Zadori, Z., Szelei, J., and Tijssen, P. (2005). SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol* **79**(20), 13129-38.



# Deuxième article

Clonage sans traces et échanges de domaines de molécules d'ADN synthétiques et/ou complexes

## Résumé du deuxième article

Fernandes, S., and P. Tijssen. 2009. Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA. *Anal. Biochem*, 385 (1):171-3.

L'utilisation de l'ADN synthétique peut permettre d'éviter plusieurs problèmes rencontrés avec les techniques classiques de biologie moléculaire lors de la manipulation d'ADN ayant de forts pourcentages en CG, des structures secondaires complexes ou des séquences répétées. Toutefois, ces ADN complexes sont parfois résistants à l'amplification par PCR et à la synthèse par l'entremise d'oligonucléotides. Par la méthode décrite ici, de longs fragments d'ADN ont été assemblés de façon séquentielle, malgré l'absence de sites de restrictions, afin de générer un plus long segment dans lequel toutes les traces de modification sont enlevées. Ce système de clonage sans traces permet donc la reconstruction de molécules d'ADN complexes de longueurs très variables à partir de fragments plus petits facilement synthétisés, et d'échanger des segments entre diverses molécules pour des analyses phénotypiques.

# Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA

S. Fernandes and P. Tijssen\*

(Subject category: recombinant technology and molecular genetics)

INRS-Institut Armand-Frappier  
Université du Québec  
531, boul. des Prairies  
Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Email: [peter.tijssen@iaf.inrs.ca](mailto:peter.tijssen@iaf.inrs.ca)

FAX: (450) 686-5627

Telephone: (450) 687-5010

## Abstract

The use of synthetic DNA can avoid problems that are sometimes encountered with conventional molecular biology techniques using DNA with high GC content, strong secondary structures or repeat sequences. However, very complex DNA may still resist PCR and synthesis of DNA from oligonucleotides. In the method described here, separately synthesized DNA segments were seamlessly joined independently of the presence of restriction sites in the target DNA. This method allowed the reconstruction of complex DNA by concatenation of easily synthesized segments and permitted repeated swapping of segments, from a few nucleotides to large fragments, of complex DNA for phenotypic analysis.

## Keywords

Cloning, complex DNA, Type IIB restriction endonucleases

Synthetic genes or genomes have become increasingly convenient tools to optimize protein expression or to obtain DNA chimeras to study regulatory elements by their related phenotypes. Chemical synthesis of DNA is usually efficiently achieved by assembly of synthetic oligonucleotides by (asymmetric) PCR [1-4]. Problems arise, however, with complex secondary structures, such as tight, extensive hairpins that resist reliable PCR-mediated recombination, repeats as well as when restriction sites are lacking. Likewise, approaches to obtain chimeras of DNA by conventional methods used in molecular biology, such as PCR-mediated recombination, usually fail with such DNA. An example of complex DNA is the right-hand terminus of the porcine parvovirus genome. The 5'-end of this single-stranded DNA (minus strand) forms a hairpin of 220 nucleotides with a high GC content and is almost perfectly base-paired, except for a bubble of a few nucleotides that correspond to the dyad symmetry nucleotides when a cruciform structure is assumed [5,6; Fig. 1]. Furthermore, this hairpin is preceded by a repeat of 127 nucleotides and no suitable restriction sites are present in the terminal 1kb of this genome preventing the use of conventional methods to swap segments from different strains for phenotypic analysis.

To study the different elements in this non-coding, terminal region of 500 nucleotides, chimeras needed to be made of the DNA from different virus strains that could then be introduced in the infectious clone (plasmid containing the complete viral genome that will produce virus upon transfection into susceptible host cells) for phenotypic studies. Moreover, these clones were required to be highly stable to prevent knockout of critical elements and overgrowth of fitter mutants.

The approach we have devised consists of synthesizing the different segments that do not pose a problem individually and then to connect them by seamless cloning using recently discovered type IIB restriction endonucleases [7, 8]. These enzymes recognize bipartite sequences (Table 1) and cut at either side of the recognition site to release it on a short DNA fragment (depending on the enzyme 30-35 nts). Each synthetic DNA segment was designed to carry half a restriction site of the type IIB enzyme and a cloning site at its terminus. Connecting the segments by cloning reconstituted the full site that allowed auto-excision and, after re-ligation, generated the desired original sequence (Fig. 1). In the example given, the auto-excising Bcgl restriction enzyme recognizes the discontinuous sequence CGA(N)<sub>6</sub>TGC. It cleaves the DNA substrate twice, at 10 nucleotides from each end of the recognition site, leaving two 2-base 3'-overhangs and excising a 34 base-pair fragment from the targeted DNA segment. The sequences of the overhangs were chosen to

correspond to the last 2 nucleotides of segment A so that ligation of fragment A to fragment B yielded seamless clones (Fig. 1). The (N)<sub>6</sub> within the discontinuous recognition sequence of the type IIB enzyme allowed the placement of another restriction site to specifically connect segments A and B, and to re-create the Bcgl recognition sequence. Since many restriction sites can be chosen for (N)<sub>6</sub>, different sites can be designed at either ends of the segment when multiple fragments need to be connected. Obviously, the approach of inserting half-sites of the auto-excising enzymes at the ends of synthetic DNA is also possible for PCR fragments by designing primers in the same fashion.

We found it useful to introduce a multiple cloning site with a defined order of restriction sites in the vector to correlate with those in the segments. When using only one type of auto-excising restriction enzyme, such as Bcgl, the connection of segments A and B needs to be fully completed before segment C can be cloned and similarly joined. However, there are quite a few alternatives to Bcgl (Table I). Our system therefore enabled us to clone a series of segments in the desired order provided each segment was separated from the next one with a different auto-excising restriction enzyme. Sometimes a vector or insert may already carry the recognition sequence of the auto-excising restriction enzyme (e.g. *bla* gene usually carries the Bcgl site). When no alternative enzymes can be used, a silent mutation can usually be introduced to inactivate the original site. Finally, an important advantage of having the different DNA segments to be studied in the same vector is that a set of clones can be generated in which all except one are connected. This segment can then be easily swapped for phenotypic studies.

The stability of the complex DNA in these clones was not self-evident. Terminal hairpins of parvoviruses are notorious for their instability. For instance, the human parvovirus B19 was already cloned and sequenced, except for the termini, in 1986 [9]; however it was only in 2004 that an infectious and stable clone was obtained [10]. We observed that using transcription terminators on both sides of the multiple cloning site (as in pSmart<sup>TM</sup>, Lucigen), lower-copy number plasmids (e.g., pSmart<sup>TM</sup>-LC, Lucigen), the use of recombination-deficient bacteria (e.g. Sure-II, Stratagene) and lower incubation temperatures (e.g. 30°C) yielded clones with excellent stability. A large number of over-night cultures (>15) and subsequent sequencing and transfection showed the integrity of the genome and maintenance of their infectivity.

The method described here has allowed convenient seamless cloning of complex DNA, from either synthetic or PCR DNA fragments, by concatenation of individually, easily synthesized segments. It provides system for rapid and very efficient exchange of segments, ranging from a few nucleotides to large fragments of complex DNA, for further phenotypic analysis.

#### Acknowledgements

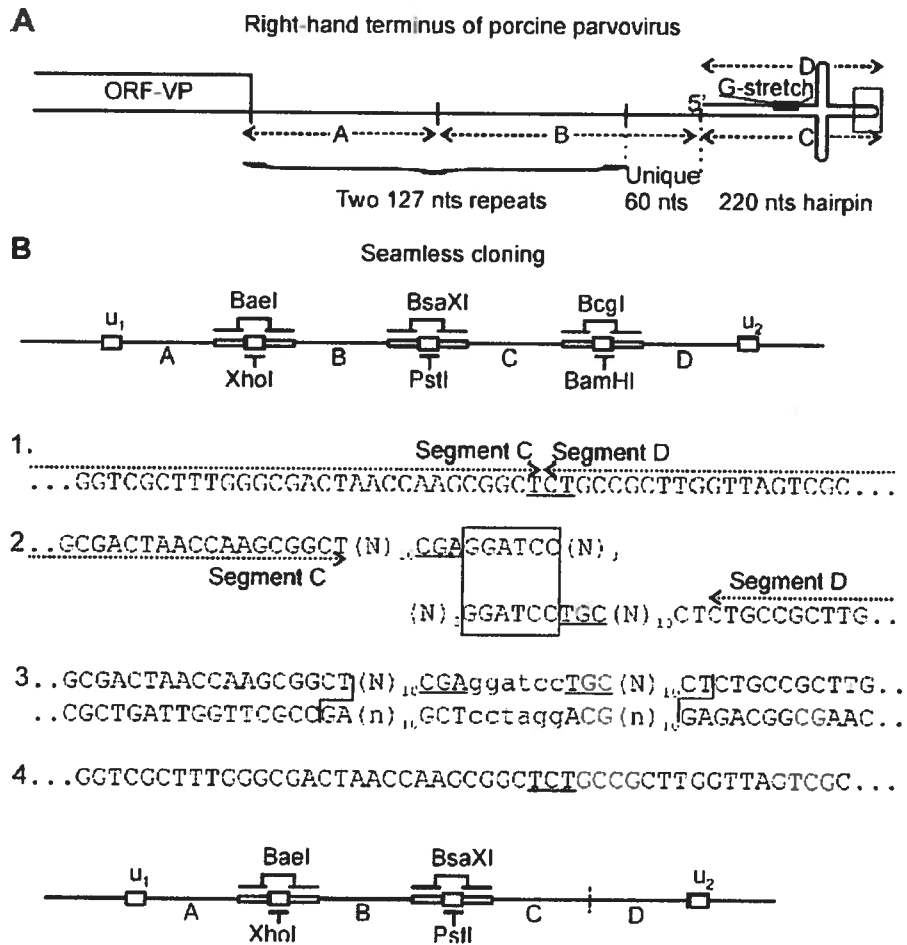
This work was supported by a grant to P.T. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. S.F. is grateful to the Fondation Armand-Frappier for a scholarship and will present these results as part of her Ph.D. thesis.

Table 1. Useful "auto-excision" restriction enzymes for seamless cloning

		pUC57	pBS	pS-Kan	pS-Amp
Ajul	(N) <sub>7/12</sub> GAA(N) <sub>7</sub> TTGG(N) <sub>11/6</sub>	0	0	1	0
Alfl	(N) <sub>10/12</sub> GCA(N) <sub>6</sub> TGC(N) <sub>12/10</sub>	1	0	1	0
Alol	(N) <sub>7/12</sub> GAAC(N) <sub>6</sub> TCC(N) <sub>12/7</sub>	0	1	0	0
Bael	(N) <sub>10/15</sub> AC(N) <sub>4</sub> GTAYC(N) <sub>12/7</sub>	0	0	0	0
Barl	(N) <sub>7/12</sub> GAAG(N) <sub>6</sub> TAC(N) <sub>12/7</sub>	0	0	0	0
Bcgl	(N) <sub>10/12</sub> CGA(N) <sub>6</sub> TGC(N) <sub>12/10</sub>	1	1	0	1
BpII	(N) <sub>8/13</sub> GAG(N) <sub>5</sub> CTC(N) <sub>13/8</sub>	0	0	0	0
BsaXI	(N) <sub>9/12</sub> AC(N) <sub>5</sub> CTCC(N) <sub>10/7</sub>	1	2	1	1
CspCI	(N) <sub>11/13</sub> CAA(N) <sub>5</sub> GTGG(N) <sub>12/10</sub>	0	0	0	0
Fall	(N) <sub>8/13</sub> AAG(N) <sub>5</sub> CTT(N) <sub>13/8</sub>	0	0	0	0
Ppil	(N) <sub>7/12</sub> GAAC(N) <sub>5</sub> CTC(N) <sub>13/8</sub>	2	3	0	1
Psrl	(N) <sub>7/12</sub> GAAC(N) <sub>6</sub> TAC(N) <sub>12/7</sub>	0	0	0	0
TstI	(N) <sub>8/13</sub> CAC(N) <sub>6</sub> TCC(N) <sub>12/7</sub>	0	0	0	0

All enzymes produce 3' overhangs. Vectors: pUC57 (GenBank Y14837), pBS is pBluescript II KS(-) (GenBank X52329), pS is pSmart-HC (high-copy) with kanamycin (GenBank AF432107) and ampicillin (Genbank AF399742) resistance genes. Position of cleavage of Alol and CspCI may shift 1 nucleotide depending on context (design similar context). Alfl in pUC57 is in MCS.





**Figure 1.** Principles of seamless cloning and domain swapping. **A.** The right terminus of a parvovirus genome is an example of DNA that resists PCR. Although it could not be synthesized as a whole domain, individual segments can be synthesized, as illustrated around the dyad symmetry (boxed). **B.1** shows the sequence of segments A and B around the dyad sequence (underlined) that were separately synthesized (**B.2**) while adding BcgI half-sites (CGA and TGC, respectively; underlined) and a BamHI site (GGATCC; double underlined). Cloning with BamHI allowed the regeneration of a complete BcgI site (**B.3**). Auto-excision through BcgI and re-ligation yielded the desired sequence (**B.4**). It is critical that the sequences of segments A and B are at the proper distance from the restriction site and that segment B is preceded by the identical sequence of the one found in segment A overhang. A large number of segments can be introduced in a single vector when different type IIB enzymes are used. A set of clones in which these fragments can still be swapped can be generated (u is a unique restriction site useful to transfer the whole insert to, e.g., an infectious clone).

## References

- [1] G. Fang, B. Weiser, A. Viosky, T. Moran, H. Burger, PCR-mediated recombination: A general method applied to construct chimeric infectious molecular clones of plasma-derived HIV-1 RNA, *Nature Medicine*. 5 (1999) 239-242.
- [2] A.S. Xiong, Q.H. Yao, R.H. Peng, X. Li, H.Q. Fan, Z.M. Cheng, Y. Li, **A simple, rapid, high-fidelity and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences**, *Nucl. Acids Res.* 32 (2004) e98.
- [3] N.A. Shevchuk, A.V. Bryksin, Y.A. Nusinovich, F.C. Cabello, M. Sutherland, S. Ladisch, **Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously**, *Nucl. Acids Res.* 32 (2004) e19.
- [4] B.F. Binkowski, K.E. Richmond, J. Kaysen, M.R. Sussman, P.J. Belshaw, **Correcting errors in synthetic DNA through consensus shuffling**, *Nucl. Acids Res.* 33 (2005) e55.
- [5] J. Bergeron, J. Menezes, P. Tijssen, Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus, *Virology* 197 (1993) 86-98.
- [6] J. Bergeron, B. Hébert, P. Tijssen P, Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates, *J. Virol.* 70 (1996) 2508-2515.
- [7] J.J. Marshall, D.M. Gowers, S.E. Halford, Restriction endonucleases that bridge and excise two recognition sites from DNA, *J. Mol. Biol.* 367 (2007) 419-431.
- [8] S. Jurenaite-Urbanaviciene, J. Serksnaite, E. Kriukiene, J. Giedriene, C. Venclovas, A. Lubys, Generation of DNA cleavage specificities of type II restriction endonucleases by reassortment of target recognition domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (2007) 10358-10363.
- [9] R.O. Shade, M.C. Blundell, S.F. Cotmore, P. Tattersall, C.R. Astell, Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis, *J. Virol.* 58 (1986) 921-936.
- [10] N. Zhi, Z. Zádori, K.E. Brown, P. Tijssen, Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19, *Virology* 318 (2004) 142-152.

## **Troisième article**

Les éléments génétiques portés par la région VP du Parvovirus porcins sont critiques à l'efficacité de la réplication du virus en culture cellulaire

## Résumé du troisième article

Fernandes, S., Boisvert, M. and Tijssen, P. 2011. Genetic elements in the VP region of Porcine Parvovirus are critical to replication efficiency in cell culture. *J. Virol.*85, 3025-9.

Les facteurs impliqués dans le contrôle de la réplication du Parvovirus Porcin (PPV) sont méconnus. Les deux souches prototypes du PPV, NADL-2 et Kresse, diffèrent dans leur pathogénécité tant *in vivo* qu'*in vitro* bien que leur séquence génomique soit quasi-identique (13 substitutions de nucléotides dans la région codante et une répétition de 127-nucléotides dans les régions non-codantes). Nous avons créé une série de chimères de ces souches afin d'identifier les éléments génétiques qui définissent l'efficacité de réplication du virus dans les cellules hôtes d'origine porcine. Nous avons démontré que les protéines de la capsid sont les déterminants ultimes de l'efficacité de la réplication virale bien qu'une interaction entre la protéine NS1 et le gène codant pour les protéines structurales et les séquences répétées est susceptible d'influer sur l'efficacité finale de l'infection.

**Genetic elements in the VP region of Porcine Parvovirus are critical to replication efficiency in cell culture**

Sandra Fernandes, Maude Boisvert and Peter Tijssen

INRS- Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

\*Corresponding author:

Peter Tijssen

INRS-Institut Armand-Frappier

Université du Québec

531, boul. des Prairies

Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Email: [peter.tijssen@iaf.inrs.ca](mailto:peter.tijssen@iaf.inrs.ca)

FAX: (450) 686-5627

Telephone: (450) 687-5010

## **Abstract**

Factors controlling Porcine Parvovirus (PPV) replication efficiency are poorly characterized. Two prototype strains of PPV, NADL-2 and Kresse, differ greatly in pathogenic capacity both in vivo and in vitro, yet their genomic sequence is nearly identical (13 single-nucleotide substitutions and a 127-nucleotide non-coding repeated sequence). We have created a series of chimeras of these strains to identify the genetic elements involved in replication efficiency in the host porcine cell line. While the capsid proteins ultimately determine viral replication fitness, interaction between the NS1 protein and the *VP* gene occurs and involves interaction with the non-coding repeated sequence.

Abstract word count: 97

Keywords: Virus replication, Porcine parvovirus, Fitness Assay

Body text word count: 1608

Porcine Parvovirus (PPV) is a non-enveloped icosahedral virus that causes reproductive failure in swine. Like its close relatives from the *Parvovirus* genus (*Parvovirinae*, *Parvoviridae* family), PPV has a linear, single-stranded 5kb DNA genome of negative polarity, characterized by distinct hairpin termini (Tattersall, 2006). The large non-structural (NS) protein, NS1, is involved in genome replication (Nuesch et al., 1998b; Rhode, 1989), transcription regulation (Hanson et Rhode, 1991; Rhode et Richard, 1987) and cytotoxicity (Anouja et al., 1997; Nuesch et Rommelaere, 2006), while the NS2 protein participates in capsid assembly (Cotmore et al., 1997) and nuclear export (Eichwald et al., 2002; Miller et Pintel, 2002). The structural proteins (VP), VP1 and VP2, assemble in a 1:10 ratio to form the 25-nm diameter capsid (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Jongeneel et al., 1986; Tsao et al., 1991). Little is known about the mechanisms that control parvoviruses tropism. For PPV, permissivity is not determined at the cell surface (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1992; Ridpath et Mengeling, 1988) since a high proportion of virus has been shown to enter cells by non-specific pathways similar to macropinocytosis (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). The genomes of two PPV strains, NADL-2 and Kresse, differ by only 13 nucleotides (nts) and by a 127-nt duplicated sequence near the right-end hairpin in the NADL-2 genome, yet they replicate with different efficiencies, both in porcine and bovine cells (Fig. 1A) (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996; Tijssen et al., 1995). Some strains of MVM, CPV and H1 parvoviruses also have variable tandem repeats (65, 60 and 55 nts, respectively) (Cotmore et Tattersall, 2006). The benefits of these repeats for replication remain controversial (Cossons et al., 1996; Shangjin, Cortey, et Segales, 2009).

Interestingly, sequencing analysis of PPV contaminants in pancrelipase extract pools suggested that the variability of North American isolates is very low compared to those in Europe, Brazil and China (Table 1) (Martins Soares et al., 2003; Zhang et al.; Zimmermann et al., 2006). While no substitutions from the Kresse strain were observed in the C-terminal portion of the VP proteins (nts 3869-4546) (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996), nearly full-length sequences of the NS gene revealed that the contaminants contained substitutions from both strains (NADL-2: c537, a1971 and Kresse : a405, g1533, c1668). A single non-synonymous substitution in the NS1 region was observed in 2 lots from 2009 (a875g, R195K). The significance of these changes is presently unknown.

To determine which genetic elements of NADL-2 and Kresse are involved in the difference in replication efficiency in the host porcine testis cell line (PT), chimeras were constructed from the infectious clones (Fernandes et Tijssen, 2009). A seamless cloning

system was used to swap segments in the right-hand terminus, including the hairpin, the 254-nt or 127-nt repeated sequences from NADL-2 (Rn) or Kresse strain (Rk), respectively, and the terminal 524 nts of the *VP* gene (Coding Region 3, CR3) (Fig. 1A). Two other segments were swapped in the rest of the genome using classical methods. The first fragment, CR1, encompassed the entire *NS* gene and the 5' region of the *VP* gene. The second segment (CR2), corresponding to the central part of the *VP* region, contained two of the three non-synonymous substitutions (D378G and H383Q, from NADL-2 to Kresse) previously identified as part of the allotropic determinant for primary bovine testis cells (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). The third residue from this determinant (S436P), within CR3, was recently shown not to be involved in tropism (S. Fernandes, M. Boisvert, J. Szelei and P. Tijssen, submitted for publication). In total, 14 different chimeras were constructed (Fig. 1B, named X-YnRxy with X being the backbone, Yn the insert from the other strain and Rxy the repeat) and transfected in PT cells (Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005). Infection of fresh cells with the transfection supernatant produced small virus stocks that were titrated by immunofluorescence (IF) (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010) and verified by sequencing of PCR fragments overlapping the entire genome. These stocks were used to infect PT cells at an MOI of 2 Fluorescent Foci forming units (FFU) to compare the replication efficiency in single-round infection assays.

### ***VP* gene elements and repeats influence replication efficiency**

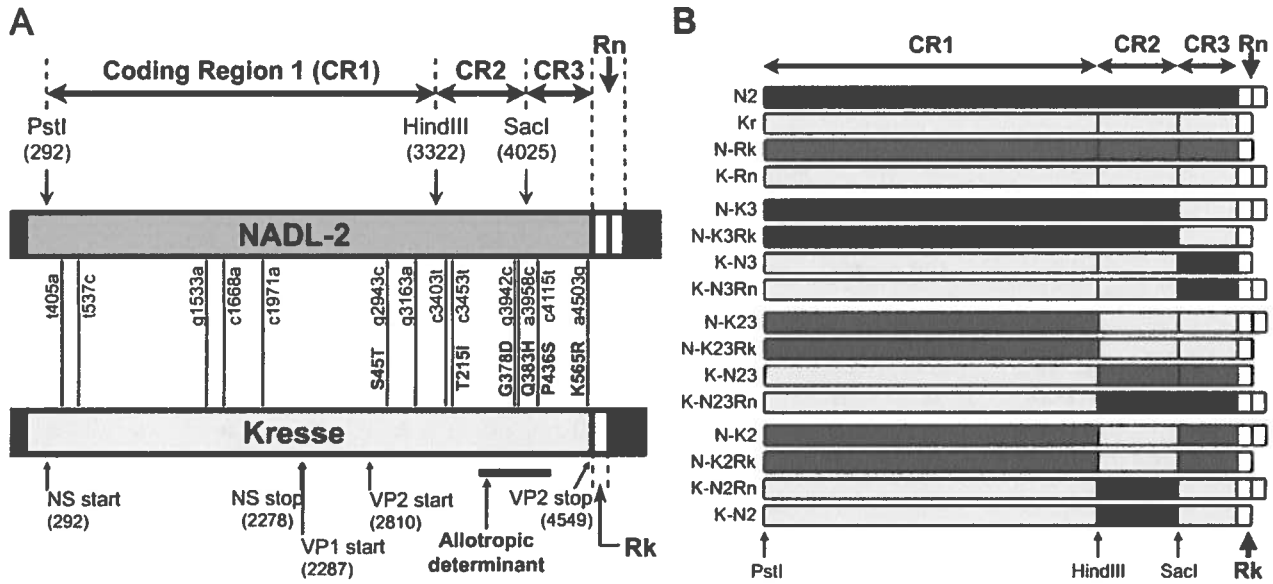
Viral genome replication was monitored by qPCR on cell lysates harvested at different times post-infection (p.i.) as described (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Wilhelm et al., 2006). Results are expressed as the increase in log viral genome copy equivalents (GCE)/cell over initial GCE/cell at 8 h p.i. (Fig. 2A, B) (Zadori et al., 2001). Early genome replication of Kresse was significantly lower than that of NADL-2 (Fig. 2A). Introducing CR2N into Kresse increased its early replication significantly or even to NADL-2 levels (K-N2, K-N2Rn, K-N23, K-N23Rn). However, the inverse construct (N-K2) did not decrease NADL-2 levels to that of Kresse, unless the repeat was also swapped (N-K2Rk). N-K23 and N-K23Rk appeared normal in early replication but had a diminished replication from 10-20 h p.i. (Fig. 2B). Replication was usually further impaired by introducing CR3N in Kresse (K-N23, K-N23Rn vs. K-N2, K-N2Rn and K-N3 vs. Kresse) unless the NADL-2 repeat was introduced too (K-N3Rn vs. K-N3). Swapping CR3N into Kresse replaces a lysine on the capsid surface by an arginine which could affect ubiquitination that was



Table 1: Sequence analysis of PPV pools in pancrelipase extracts produced in North America between 2005 and 2009.

	Nt										
	403	405	537	875	1533	1668	1971	<b>3942</b>	<b>3958</b>	<b>4115</b>	4503
NADL-2	c	g	c	<i>a</i>	a	a	a	<b>a</b>	<b>c</b>	<b>t</b>	g
Kresse	c	a	t	<i>a</i>	g	c	c	<b>g</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	a
PPVAx2005	n.d.	n.d.	c	n.d.	g	c	a	<b>g</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	a
PPVAx2007	tc	ta	c	n.d.	g	c	a	<b>g</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	a
PPVAx2009-1	tc	ta	c	<i>g</i>	g	c	a	<b>g</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	a
PPVAx2009-2	tc	ta	c	<i>g</i>	g	c	a	<b>g</b>	<b>a</b>	<b>c</b>	a

PPV genomes were amplified by overlapping PCR fragments and sequenced by standard methods. Some substitutions were not fully conserved (nts 403 and 405). Sequences covered the following nucleotides in the different samples: PPVAx2005:1279-2345 and 3848-4679, PPVAx2007: 308-832, 1018-2343 and 3869-4675, PPVAx2009-1: 303-2343 and 3842-4677, PPVAx2009-2: 303-2369 and 3862-4546 and were compared to the sequences of NADL-2 (NCBI Reference Sequence: NC\_001718.1) and Kresse strains (GenBank: U44978.1). Residues in **bold** are within the Bgl II fragment (allotropic determinant) identified in bovine cells (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Residues in *italics* are different from both prototype strains. n.d.: not determined.



**Fig. 1. Construction of chimeras from the NADL-2 and Kresse PPV strains. A.** The genomes of the two wild-type strains differ by 13 nts in their coding regions (CR1-3) (grey boxes) and by the repeated sequence downstream of the VP gene (white boxes). No differences are located within the hairpin termini (black boxes). The 127-nt (Rk) or the 254-nt repeated sequence (Rn) and the terminal 524 nts of the coding region (CR3) were amplified by PCR and swapped between backbones by seamless cloning (Fernandes et Tijssen, 2009). The CR1 and CR2 fragments were swapped in the infectious clones by classical methods. The CR1 fragment (PstI-HindIII, nts 290-3322) contained the entire NS coding region, including five synonymous mutation from NADL-2 to Kresse (a405g, c537t, a1533g, a1668c, a1971c) and the first of the non-synonymous substitutions in the VP coding region (T45S in VP2 and L42V in SAT from NADL-2 to Kresse) (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993; Zadori, Szelei, et Tijssen, 2005). The CR2 fragment (HindIII-SacI, nts 3322-4025) contained both silent mutations in the VP gene (nts g3163a, c3403t) and three of the non-synonymous substitutions (I215T, D378G, H383Q, VP2 numbering NADL-2 to Kresse). The C-terminal portion of the VP coding region contained the final two substitutions between the strains (VP2 residues S436P and R565K). Residues D378G and H383Q in CR2 and S436P in CR3 are in the BglII fragment that was previously identified as the allotropic determinant of the PPV strains in primary bovine testis cells (Bergeron, Menezes, et Tijssen, 1993). **B.** A total of 14 chimeras were constructed by swapping CR1, CR2, CR3 and Rn or Rk between the NADL-2 (N2, dark grey), and Kresse (Kr, light grey) strains. Naming scheme is X-YnRxy with X being the backbone, Yn the insert from the other strain and Rxy the repeat.

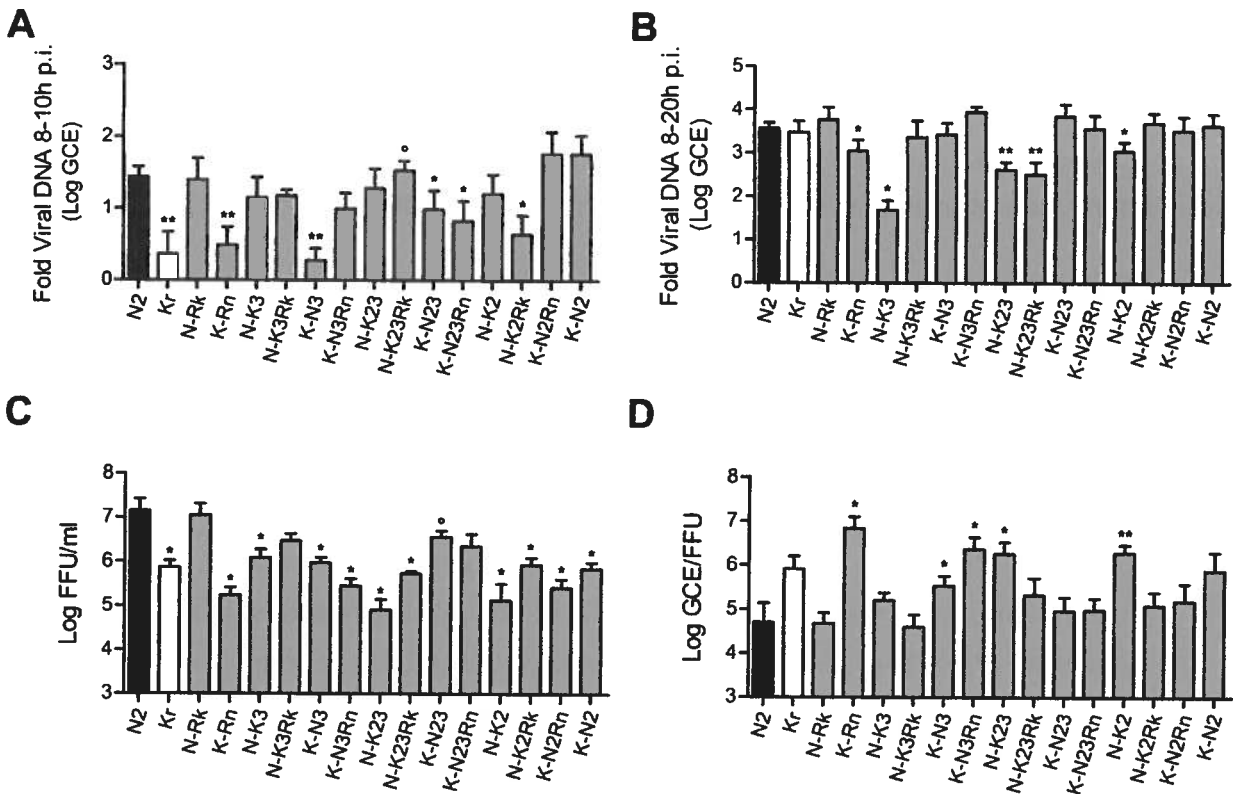
recently shown to be critical for PPV infection (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). At 20 h p.i., most differences in viral DNA replication were no longer apparent (Fig. 2B). Notable exceptions were the above mentioned N-K23 and N-K23Rk, and construct N-K3, that all showed surprisingly normal replication between 8 and 10 h p.i.. In contrast, N-K3Rk displayed replication level similar to other chimeras. These results suggested that R regions interacted with elements in the VP gene or the capsid, both early and late in the infection.

### **CR2 and CR3 from NADL-2 are required for optimal virus production**

Infectious virus production was monitored at different times p.i. by titration of supernatants on PT cells by IF (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). Release of virus was apparent by 16 h p.i. (data not shown) and continued to increase to 24 h p.i. (Fig. 2C), by which time cytopathic effects were apparent. As seen with late genome replication, combining CR2K or CR3K with Rn markedly decreased infectious virus production. Furthermore, chimeras containing both CR2N and CR3N released more infectious virus regardless of Rn/Rk or CR1. No differences were observed in VP protein accumulation at 16 h p.i. as assessed by Western blotting, suggesting that lower virus production was not due to reduced VP synthesis (data not shown). Capsid stability may be increased when CR2 and CR3 from the same strain are combined since VP2 residues 378, 383 from CR2 are positioned on adjoining sides of loop3 while residue 565 from CR3 is positioned on the loop immediately adjacent to it, in close contact with the conserved L384 (Simpson et al., 2002).

### **CR2K and Rn are incompatible for efficient packaging**

The infectivity ratio of the virus released from each chimera was determined by comparing the number of viral genome copies in the supernatant (by qPCR) to the infectious titres measured by IF. At 20 h p.i. (Fig 2D), concurrent with the bulk release of virus, significant differences were seen in the infectivity ratios, most notably when CR2K and Rn were combined (K-Rn, K-N3Rn, N-K23, N-K2). Although VP residues 215, 378 and 383 are located on or near the capsid surface, we propose that the DNA sequence may also interact with infectious virus production. Furthermore, chimeras containing both CR2N and CR3N released more infectious virus regardless of Rn/Rk or CR1. No differences were observed in VP protein accumulation at 16 h p.i. as assessed by Western blotting, suggesting that lower virus production was not due to reduced VP synthesis (data not shown). Capsid stability



**Fig. 2. Replication of the chimeras and wild-type strains in single-round infection assays.** Early (A) and late (B) viral genome replication. Viral genome copy numbers were measured by qPCR and normalized to cell numbers using the *c-myc* gene to account for differences in efficiency in DNA extractions and between independent experiments (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). Results are expressed as fold-increase in Log genome copy equivalents (GCE) between 8-10 h p.i. (A) or between 8-20 h p.i. (B) (mean + SD from at least three representative independent experiments). C. Infectious virus production at 24 h p.i. Supernatant from cells infected with either chimera were titrated by immunofluorescence (IF) (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010) and expressed as (mean + SEM) Log FFU/ml, from at least three representative independent experiments. D. Infectivity of the virus released at 20 h p.i. Supernatants from infected cells were titrated by IF and viral genome copy numbers were determined by qPCR. Results are expressed as (mean + SD) Log GCE/FFU. Means were compared by unpaired two-tailed *t* test with N2 \**p*<0.05, \*\**p*<0.01, or with Kr °<0.01.

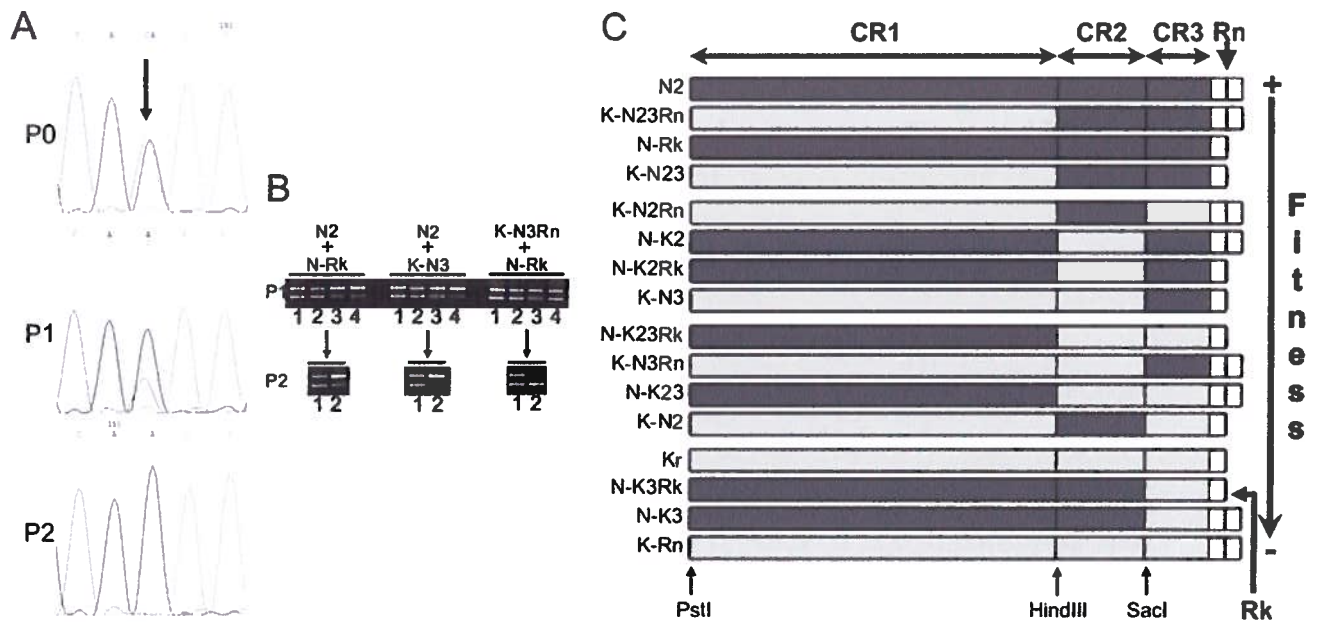
may be increased when CR2 and CR3 from the same strain are combined since VP2 residues 378, 383 from CR2 are positioned on adjoining sides of loop3 while residue 565 from CR3 is positioned on the loop immediately adjacent to it, in close contact with the conserved L384 (Simpson et al., 2002).

### **CR2K and Rn are incompatible for efficient packaging**

The infectivity ratio of the virus released from each chimera was determined by comparing the number of viral genome copies in the supernatant (by qPCR) to the infectious titres measured by IF. At 20 h p.i. (Fig 2D), concurrent with the bulk release of virus, significant differences were seen in the infectivity ratios, most notably when CR2K and Rn were combined (K-Rn, K-N3Rn, N-K23, N-K2). Although VP residues 215, 378 and 383 are located on or near the capsid surface, we propose that the DNA sequence may also interact with the packaging machinery. Recent studies on MVM have shown that the NS1 protein binds with different affinities to moderately conserved consensus binding sites (TGGT) scattered across the genome and may serve to stabilise the DNA much like chromatin (Cotmore, Gottlieb, et Tattersall, 2007). Interestingly, in the PPV coding regions, there are 21 potential NS1-binding sites in the CR2 fragment while only 56 more are found in the rest of the protein coding sequence (21 (TGGT) in 703nts or 1 site every 33nts in CR2 vs. 56 in 3554 nts or 1 in every 63 nts in CR1 and CR3 combined). Furthermore, the t3453c substitution (VP2 I215T, from NADL-2 to Kresse) potentially creates an additional binding site within the Kresse genome. Since NS1 binding sites also occur in the repeated region (3 in Rn and 2 in Rk), negative interactions may occur between the extra binding sites found by combining CR2K and Rn. This may slow the packaging process such that a higher percentage of genomes would be partially encapsidated, therefore increasing the GCE to FFU ratio.

### **CR2-3 from NADL-2 ultimately determines viral fitness**

To identify the genomic fragment that most significantly contributed to replication efficiency, a fitness competition assay was designed. All possible pairs of chimeras were co-transfected in PT cells. After two subsequent passages, the dominant chimera in the supernatant was identified by comparing the sequence (Fig. 3A) and the size of PCR



**Figure 3. Relative replication fitness of the chimeras.** **A.** The chimeras were co-transfected in pairs in PT cells and the supernatants were used to re-infect cells for one or two viral passages. PCR on final supernatants (Sn) were analysed by sequencing (**A**) to determine dominance. Example is shown for amplification of CR2 (c3958a) after co-transfection of chimeras N-K3 and N-K2Rk (P0: sequencing of input DNA for transfection, P1 : Sequencing of Sn from 1<sup>st</sup> viral passage, P2 : Sequencing of Sn from 2<sup>nd</sup> viral passage). **B.** Dominance was also verified by comparing the amount of DNA in Sn at different times post-transfection (P1) and after first viral passage (P2), in co-transfection with chimeras differing in the origin of Rn (top band) and Rk (bottom band). P1: PCR on Sn from co-transfections with (N2 and N-Rk), (N2 and K-N3) or (K-N3Rn and N-Rk) 1: PCR on input DNA, 2: PCR on Sn harvested at 24 h, 3: PCR on Sn harvested at 48h , 4: PCR on Sn harvested at 72 h. P2: Sn harvested at 24 h from co-transfections were used to infected fresh cells, 1: PCR on input virus (same as P1 #2), 2: PCR on Sn harvested at 48 h p.i. from 1<sup>st</sup> viral passage. Based on shown results N2 is dominant over N-Rk, N2 is dominant over K-N3 and N-Rk is dominant over K-N3Rn **C.** Relative replication fitness of each chimera was determined from dominance of each clone in co-transfection and re-infection experiments (120 combinations in total, 2 rounds of re-infection, in three independent experiments) determined as shown in A and B.

fragments (Fig. 3B). Sorting the chimeras according to dominance indicated that CR2-3N was the most important determinant of fitness in PT cells, while Rn was a secondary factor (Fig. 3C). When all else was equal, clones containing CR3N were dominant over CR3K, suggesting that residues (S436 and R565) are crucial to viral fitness. In the prevailing chimeras containing Rn, CR1 invariably came from the same background as CR3, while CR1 matched CR2 when combined with Rk. These results suggest that the NS proteins may interact differently with the viral genome depending on the origin of the repeated sequence, possibly due to the low-affinity binding sites scattered throughout the genome. The fitness assay allowed an improved ranking of all the chimeras compared to the general information given in Fig. 2. As expected, the chimeras with the relatively fittest replication (Fig. 3C) demonstrated high FFU in single-round production (Fig. 2C) whereas clones showing a high GCE to FFU ratio (Fig. 2D.) displayed lower fitness.

Comparison of NADL-2 and Kresse chimeras highlighted the multiple levels that influence replication efficiency. While the *VP* gene (regions CR2-3) from the NADL-2 strain was the most important for viral fitness, both the proteins and the genome itself could be involved since late genome replication was low in NADL-2 chimeras containing either CR2K or CR3K. Furthermore, the NADL-2 capsid may have slightly higher stability than Kresse while packaging was more efficient than in hybrid capsids. Finally, we have demonstrated that residues outside the bovine cell allotropic determinant are involved in replication efficiency of Kresse and NADL-2 strains in porcine cells.

This research was funded in part by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada to P.T. and by the Fondation Armand-Frappier for scholarships to S.F. and M.B.

## References

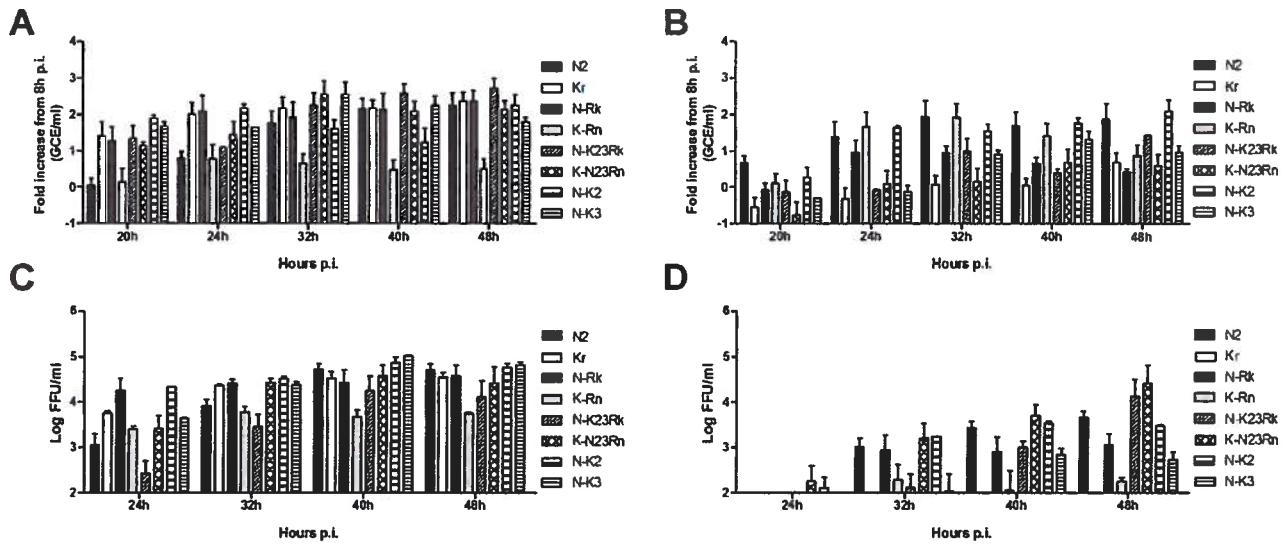
1. **Anouja, F., R. Wattiez, S. Mousset, and P. Caillet-Fauquet.** 1997. The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* **71**:4671-8.
2. **Bergeron, J., B. Hebert, and P. Tijssen.** 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* **70**:2508-15.
3. **Bergeron, J., J. Menezes, and P. Tijssen.** 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* **197**:86-98.
4. **Boisvert, M., S. Fernandes, and P. Tijssen.** 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol* **84**:7782-92.
5. **Cossons, N., M. Zannis-Hadjopoulos, P. Tam, C. R. Astell, and E. A. Faust.** 1996. The effect of regulatory sequence elements upon the initiation of DNA replication of the minute virus of mice. *Virology* **224**:320-5.
6. **Cotmore, S. F., A. M. D'Abramo, Jr., L. F. Carbonell, J. Bratton, and P. Tattersall.** 1997. The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**:267-80.
7. **Cotmore, S. F., R. L. Gottlieb, and P. Tattersall.** 2007. Replication initiator protein NS1 of the parvovirus minute virus of mice binds to modular divergent sites distributed throughout duplex viral DNA. *J Virol* **81**:13015-27.
8. **Cotmore, S. F., and P. Tattersall.** 2006. A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses, p. 171-188. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, UK.
9. **Eichwald, V., L. Daeffler, M. Klein, J. Rommelaere, and N. Salome.** 2002. The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* **76**:10307-19.
10. **Fernandes, S., and P. Tijssen.** 2009. Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA. *Anal Biochem* **385**:171-3.



11. **Hanson, N. D., and S. L. Rhode, 3rd.** 1991. Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J Virol* **65**:4325-33.
12. **Jongeneel, C. V., R. Sahli, G. K. McMaster, and B. Hirt.** 1986. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* **59**:564-73.
13. **Martins Soares, R., A. Cortez, M. B. Heinemann, S. M. Sakamoto, V. G. Martins, M. Bacci, Jr., F. M. De Campos Fernandes, and L. J. Richtzenhain.** 2003. Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J Gen Virol* **84**:1505-15.
14. **Miller, C. L., and D. J. Pintel.** 2002. Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J Virol* **76**:3257-66.
15. **Nuesch, J. P., S. Dettwiler, R. Corbau, and J. Rommelaere.** 1998. Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J Virol* **72**:9966-77.
16. **Nuesch, J. P., and J. Rommelaere.** 2006. NS1 interaction with CKII alpha: novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity. *J Virol* **80**:4729-39.
17. **Oraveerakul, K., C. S. Choi, and T. W. Molitor.** 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J Virol* **66**:715-22.
18. **Rhode, S. L., 3rd.** 1989. Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein. *J Virol* **63**:4249-56.
19. **Rhode, S. L., 3rd, and S. M. Richard.** 1987. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J Virol* **61**:2807-15.
20. **Ridpath, J. F., and W. L. Mengeling.** 1988. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res* **10**:17-27.
21. **Shangjin, C., M. Cortey, and J. Segales.** 2009. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Res* **140**:209-15.
22. **Simpson, A. A., B. Hebert, G. M. Sullivan, C. R. Parrish, Z. Zadori, P. Tijssen, and M. G. Rossmann.** 2002. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol* **315**:1189-98.

23. **Tattersall, P.** 2006. The evolution of parvovirus taxonomy, p. 5-14. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, UK.
24. **Tijssen, P., J. Bergeron, R. Dubuc, and B. Hébert.** 1995. Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Seminars in Virology* **6**:319-328.
25. **Tsao, J., M. S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Luo, T. J. Smith, M. G. Rossmann, R. W. Compans, and et al.** 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**:1456-64.
26. **Wilhelm, S., P. Zimmermann, H. J. Selbitz, and U. Truyen.** 2006. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J Virol Methods* **134**:257-60.
27. **Zadori, Z., J. Szelei, M. C. Lacoste, Y. Li, S. Gariépy, P. Raymond, M. Allaire, I. R. Nabi, and P. Tijssen.** 2001. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**:291-302.
28. **Zadori, Z., J. Szelei, and P. Tijssen.** 2005. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol* **79**:13129-38.
29. **Zhang, R., S. Yang, W. Zhang, T. Zhang, Z. Xie, H. Feng, S. Wang, and X. Xia.** Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China. *Virus Genes* **40**:397-402.
30. **Zimmermann, P., M. Ritzmann, H. J. Selbitz, K. Heinritzi, and U. Truyen.** 2006. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J Gen Virol* **87**:295-301.

# **Résultats supplémentaires**



**Figure S1. Réplication des chimères et des souches sauvages du PPV au cours d'un cycle d'infection dans les cellules bovines. A. B.** Réplication du génome viral à différents temps p.i. dans les cellules bovines F4 (A) et G11 (B). Le nombre de copie de génome du virus (GCE/ml) a été mesuré par PCR quantitatif à partir de lysates de cellules infectées (MOI de 2) et normalisé à la quantité de génomes initiaux (mesurés à 8h p.i.). Les résultats sont exprimés en (moyenne + écart type) Log GCE/ml de deux expériences indépendantes. **C. D.** Production de virions infectieux à différent temps p.i. suite à l'infection des cellules F4 (C) ou G11 (D) à une MOI de 2. Les surnageants des cellules ont été récoltés et titrés par immunofluorescence indirecte sur les cellules indicatrices porcines (PT) et les titres sont exprimés en (moyenne + écart type) Log Unités formatrices de Foyers Fluorescent/ml (Log FFU/ml) de deux expériences indépendantes.

# Discussion

Les travaux présentés dans cette thèse constituent une toute première analyse des mécanismes qui influence l'allotropisme du PPV *in vitro* dans divers types de cellules établis à partir d'une culture primaire d'un organisme non-hôte. Notre système d'étude est unique du fait que les lignées cellulaires démontrent un éventail de susceptibilité à l'infection. D'une part, la lignée cellulaire D10 est complètement restrictive à l'infection ce qui permet d'identifier les mécanismes essentiels à la réplication du virus influençant la permissivité des cultures. La lignée G11 est semi-permissive à l'infection par la souche vaccinale, NADL-2, tandis qu'elle est restrictive à la souche Kresse, permettant de définir les mécanismes qui influencent l'efficacité de la réplication de souches de PPV qui ne diffèrent qu'en quelques nucléotides. Enfin, la lignée cellulaire bovine F4 est pleinement permissive à l'infection par le PPV, permettant d'une part de servir de modèle comparatif opposé aux cellules D10 et d'autre part, d'établir les différences entre les espèces hôtes, qui rendent les cellules hétérologues plus ou moins sensibles à l'infection (Tableau 1).

Nos travaux ont permis de démontrer que l'allotropisme du PPV est défini à plusieurs niveaux distincts. En effet, nous avons noté que l'efficacité des étapes précoces du cycle de réplication viral détermine la sévérité de la restriction, tandis que les étapes tardives influent sur la productivité finale de l'infection. La caractérisation primaire des étapes de la réplication virale où l'allotropisme est déterminé constitue donc un système modèle performant qui permettra l'analyse détaillée des mécanismes moléculaires de l'infection et l'élucidation des interactions du PPV avec la cellule hôte lors du cycle infectieux.

## **1. Restriction totale : la lignée cellulaire bovine D10**

L'infection de la lignée bovine D10 avec l'une ou l'autre souche de PPV est complètement restrictive, bien que le virus soit internalisé par la cellule. Dans ces cellules, seule une très faible quantité de l'intermédiaire de transcription a été détectée, et aucune augmentation significative de l'ADN viral n'a été observée. Ainsi, la réplication virale est bloquée aux étapes précoces, entre l'entrée au niveau de la surface cellulaire et l'amplification primaire du génome au noyau.

Tableau 1: Efficacité relative des étapes restrictives à l'infection par les souches de PPV

Souche	NADL-2				Kresse			
	PT	F4	G11	D10	PT	F4	G11	D10
Réplication du génome	++++	++	++	-	+++	++	+	-
Synthèse des VPs	+++	++++	++	+	+++	+++	+	-
Localisation des VPs	ok	ok	non	-	ok	ok	ok	-
CPE	++++	++++	++	-	+++	++	-	-
Infection productive	++++	++	+	-	+++	++	-	-

Légende: ++++ : Efficacité maximale, +++: Efficacité prononcée, ++ : Efficacité moyenne, + Efficacité faible, - Efficacité nulle ou non observable.

## 1.1 Livraison du génome au noyau

Plusieurs étapes distinctes peuvent limiter la livraison du génome au noyau, le site de réplication des parvovirus. D'une part, suite à l'internalisation, le transport dans divers compartiments de la voie endosomale permet les modifications des protéines de la capsid tels que le clivage de la VP2 en VP3 et l'externalisation de la région N-terminale de la VP1 (Farr, Cotmore, et Tattersall, 2006; Mani et al., 2006). La PLA<sub>2</sub> virale permet alors l'évasion des virions des vésicules de la voie endosomale, bien que ce processus soit inefficace même dans les cellules pleinement permissives à l'infection (Farr, Zhang, et Tattersall, 2005; Mani et al., 2006; Suikkanen et al., 2003b). L'accumulation périnucléaire des virions du PPV et de plusieurs autres parvovirus suggère que la livraison du génome viral au noyau est aussi une étape limitant l'efficacité de l'infection (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Suikkanen et al., 2003a).

Chez plusieurs membres du genre *Parvovirus*, dont le MVM, le CPV et le PPV, l'interaction avec le protéasome au cours des étapes précoces de l'infection est requise (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Ros, Burckhardt, et Kempf, 2002; Ros et Kempf, 2004). En effet, le traitement des cellules avec le MG132 ou la lactacystin, soit des inhibiteurs des activités protéolytiques du protéasome, réduit grandement l'infection, seulement lorsque ceux-ci sont ajoutés au cours des dix premières heures d'infection (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010). Selon les cinétiques de la réplication du génome virale, l'interaction avec le protéasome se fait avant la livraison du génome au noyau. Étonnamment, les protéines structurales du MVM ne sont pas ubiquitinylées au cours de l'infection tandis que celles du PPV le sont, suggérant que les mécanismes d'interaction des parvovirus avec le protéasome diffèrent selon l'espèce (Boisvert, Fernandes, et Tijssen, 2010; Ros et Kempf, 2004). Au contraire, chez les dépendovirus, les activités du protéasome entraînent la dégradation des AAV (Douar et al., 2001; Duan et al., 2000) et l'inhibition des activités protéolytiques du protéasome augmente l'efficacité de la translocation nucléaire des virions et l'expression de gènes rapporteurs (Jennings et al., 2005; Yan et al., 2002). L'effet inhibiteur du protéasome dépend toutefois du type cellulaire (Denby, Nicklin, et Baker, 2005). Ainsi, à l'instar des AAV, le PPV pourrait interagir de façon divergente avec le protéasome au cours des étapes précoces de l'infection selon l'origine de



la cellule, par exemple entre les cellules D10 et F4. De plus, puisque l'activité du protéasome est régulée de façon différentielle dans divers types de cellules, il est concevable qu'une augmentation de l'activité protéolytique puisse réduire l'efficacité de l'infection dans certaines lignées de cellules restrictives. L'analyse plus détaillée des interactions du virus avec le complexe protéique, actuellement à l'étude dans le laboratoire, permettra de clarifier les mécanismes précoces de l'infection par le PPV.

## 1.2 Réplication du génome

Outre l'expression de divers cofacteurs de la Pol $\delta$ , impliquée dans la réplication du génome (Bashir et al., 2000; Cossons, Faust, et Zannis-Hadjopoulos, 1996), un autre mécanisme pouvant limiter l'efficacité de l'infection du PPV dans les cellules restrictives est la surexpression d'une protéine accessoire aux hnRNP A/B, nommée DBP40. Il a été démontré que cette protéine pouvait se lier au génome simple-brin du FPV et que sa surexpression inhibe la réplication de ce virus (Wang et Parrish, 1999). Puisque l'expression des hnRNPs est reconnue pour être altérée dans divers processus de transformation cellulaire (Han, Tang, et Smith, 2010), ce mécanisme pourrait contribuer à la restriction de la réplication du PPV dans certain types cellulaires, dont les cellules bovines D10. Par ailleurs, il a été démontré que l'efficacité de la réplication du MVM est augmentée dans les cellules déficientes pour les composantes de la réparation de bris double-brins de l'ADN cellulaire (Tauer et al., 1996). Les cellules déficientes en la protéine Ku86 sont aussi plus susceptibles à la transduction par les AAVs recombinants (AAVr). Il a été proposé que la liaison de la protéine Ku86 au niveau des structures en épingles inhibe la conversion du génome simple-brin en l'intermédiaire double brin (Zentilin, Marcello, et Giacca, 2001). Cette augmentation de transduction par les AAVr a aussi été observée dans les cellules où la sous-unité Ku70 est réduite par traitement aux ARN interférents (Fattah et al., 2008). À l'opposé, la protéine Rad52, qui se lie aussi au niveau des structures en épingles de l'ADN, permet d'augmenter la susceptibilité à la transduction par le AAV (Zentilin, Marcello, et Giacca, 2001). Ces protéines constituent donc des candidates à évaluer dans les cellules D10, puisque l'expression de l'une ou plusieurs d'entre elles permettraient d'expliquer la faible conversion du génome du PPV observée dans la lignée restrictive.

## 2. Restriction partielle : la lignée cellulaire G11

Suite à l'infection, la lignée G11 est semi-permissive à la souche NADL-2 tandis qu'elle est restrictive à la souche Kresse. Puisque la réplication du génome viral n'a lieu qu'avec la souche NADL-2, ceci suggère fortement que les cofacteurs cellulaires interagissent de façon différentielle avec le génome ou avec les protéines de la capsid de chacune des souches.

### 2.1 Transport des protéines

D'une part, l'accumulation de capsides au niveau du cytoplasme des cellules G11 infectées avec la souche NADL-2 reflète possiblement une étape tardive normale mais transitoire de l'infection. En effet, la lyse retardée observée dans les cellules G11 pourrait permettre l'accumulation des capsides au niveau du cytoplasme suite à leur export du noyau. Cette étape pourrait aussi avoir lieu dans les cellules porcines et les cellules bovines F4. Toutefois, ces cellules démontrent des effets cytopathiques plus prononcés et une lyse plus rapide de sorte que l'accumulation des capsides au cytoplasme ne serait pas visible. De plus, ce phénotype n'est observable que dans une fraction des cellules infectées (soit une cellule sur cinq), suggérant qu'il pourrait s'agir d'une étape brève. Des études plus approfondies sur la distribution intracellulaire des protéines structurales et des capsides au cours d'infections synchronisées permettraient de mieux définir le phénotype. De plus, puisque l'export des capsides requiert la participation de la protéine NS2 qui interagit avec Crm1 (Engelsma et al., 2008), l'accumulation des capsides pleines au niveau du cytoplasme pourrait être bloquée par l'utilisation de la leptomycin B, un inhibiteur spécifique de la karyophérine Crm1 (Kudo et al., 1998).

Par ailleurs, l'interaction de la protéine NS1 avec diverses PKC cellulaires et avec la CKII $\alpha$  peut altérer la spécificité de ces protéines kinases (Lachmann et al., 2008; Nuesch et Rommelaere, 2006). Ainsi, il a récemment été proposé que la NS1 serait indirectement impliquée dans l'export des capsides, en favorisant la phosphorylation de la région 2Nt (Introduction, Figure 9) (Nuesch et al., 2009). Enfin, la très faible proportion de cellules G11

synthétisant les protéines VP empêche possiblement la détection de ce même phénotype lors de l'infection avec la souche Kresse. L'interaction des protéines virales avec les protéines kinases cellulaires au cours de l'infection par le PPV seraient donc des cibles moléculaires qui expliqueraient la plus faible productivité de l'infection par la souche NADL-2 dans la lignée G11 par rapport à la lignée F4.

## 2.2 Amplification du génome

La restriction au cours des étapes précoces de l'infection est le principal déterminant de l'allotropisme de la souche Kresse dans les cellules G11. En effet, la très faible réplication du génome viral dans cette lignée cellulaire réduit grandement l'efficacité des étapes subséquentes du cycle d'infection bien que la matrice de transcription soit synthétisée. Puisque la réplication du génome de la souche NADL-2 est beaucoup plus élevée qu'observée pour Kresse, ceci suggère que les facteurs nécessaires à l'amplification du génome viral interagissent de façon différentielle avec le génome de ces deux souches. Bien que la protéine NS1 soit impliquée dans toutes les étapes de réplication du génome, nous proposons que l'interaction différentielle se fasse plutôt au niveau des partenaires cellulaires qui se lient au génome viral. D'une part, la région du promoteur P4 est identique entre les souches NADL-2 et Kresse et toutes les substitutions au niveau de la région codante pour les protéines NS sont synonymes (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Ainsi, seul l'usage de codons préférentiels peut influencer sur l'accumulation de la protéine NS1 entre ces souches. Selon les tables de fréquence d'usage des codons et des gènes codant pour les ARNt chez *Bos taurus* (bovin) et *Sus scrofa* (porcin) (Nakamura, Gojobori, et Ikemura, 2000), la protéine NS1 de Kresse porte les codons les plus fréquemment utilisés. De plus, aucune différence significative n'a été observée dans l'efficacité de la réplication des deux souches dans les cellules bovines F4, suggérant que des différences de traduction de la protéine n'agiraient pas sur l'efficacité de la réplication du génome viral. Toutefois, la NS1 se lie à divers sites TGGT répartis sur l'ensemble du génome (Cotmore, Gottlieb, et Tattersall, 2007). Tel que suggéré pour la réplication des diverses chimères dans les cellules PT, la présence de sites additionnels au niveau de la région répétée de 127-nucléotides dans le génome de NADL-2 pourrait favoriser la réplication du génome de la souche vaccinale par rapport à la souche Kresse. Des résultats préliminaires obtenus en comparant la réplication du génome des diverses chimères des souches NADL-2 et Kresse

dans les cellules G11 soutiennent cette hypothèse (Figure Supplémentaire 1B, résultats non publiés). En effet, la chimère comportant le génome complet de Kresse mais ayant la répétition provenant de NADL-2 (K-Rn) répliquait le génome de façon efficace mais était faiblement productive (Figure Supplémentaire 1D). Une analyse plus détaillée de la réplication de toutes les chimères dans la lignée cellulaire G11 devrait permettre de mieux définir la restriction de la souche Kresse.

### **3. Infection permissive : La lignée cellulaire bovine F4**

Bien que l'infection par les deux souches soit permissive dans les cellules bovines F4, la réplication du génome est retardée par rapport aux cellules porcines. D'une part, ceci pourrait refléter une réduction dans l'efficacité de livraison du génome au noyau et des étapes précoces de l'infection tels que décrite ci-haut pour la lignée cellulaire D10. Ainsi, l'accumulation des génomes viraux au noyau serait retardée et l'amplification ne serait détectable qu'à des temps d'infection plus longs. Ces observations sont aussi en accord avec la plus faible sensibilité des cellules bovines suite à l'infection à de faibles MOI. En effet, dans ces cellules, l'infection à faible MOI conduit à une plus faible production de virus infectieux, tandis que l'infection à de fortes MOI entraîne une production maximale. Ceci indique qu'au départ, les cellules bovines requièrent plus de copies du virus pour l'infection productive. Au contraire, la productivité de l'infection à de faibles MOI est supérieure dans les cellules porcines, puisque le virus relâché lors de la première ronde d'infection peut infecter de nouvelles cellules en division avant que celles-ci n'atteignent la confluence. Ainsi, si la livraison du génome au noyau est moins efficace dans les lignées cellulaires bovines, les étapes initiales de la réplication virale sont retardées à chaque ronde d'infection, rendant ultimement ces cellules moins sensibles à l'infection par le PPV.

Récemment, il a été démontré que la protéine PKR pouvait être activée par les structures secondaires formées par les ARNm R1 du MVM (Ventoso, Berlanga, et Almendral, 2010). Cette protéine kinase est l'une des composantes importantes de la réponse antivirale cellulaire, puisqu'elle peut être activée par la présence d'ARN double-brin, formé lors de la réplication des virus ayant un génome d'ARN. L'activation de PKR entraîne entre autres la phosphorylation de la sous-unité eIF2 $\alpha$  du complexe d'initiation de la traduction, et bloque l'élongation de la transcription. Ainsi, il a été démontré que les

cellules déficientes en PKR sont plus permissives à l'infection par les parvovirus. Il serait donc intéressant de comparer l'état de la protéine kinase dans les lignées F4 et D10, qui démontrent des phénotypes inversés par rapport à la susceptibilité de l'infection par le PPV.

## 4. L'infection permissive : réplication virale dans les cellules PT

### 4.1 Influence des protéines structurales

Chez les cellules PT, l'étude de la réplication des chimères a permis de déterminer que les protéines de la capsid de la souche NADL-2 sont le déterminant ultime de l'efficacité de réplication du PPV. Ainsi, une plus grande stabilité et une interaction plus favorable avec des cofacteurs cellulaires ont été proposées pour expliquer l'augmentation de l'efficacité de la réplication de la souche vaccinale dans ces cellules porcines. Au cours d'une seule ronde d'infection, nous avons aussi observé que la réplication du génome de la souche NADL-2 est plus précoce que celle de la souche Kresse bien que cet effet était transitoire. Nous proposons que les facteurs cellulaires qui entraînent la décapsidation du génome puissent être favorisés dans les cellules PT avec la souche NADL-2. En ce sens, des études récentes sur l'accessibilité du génome suggèrent que le génome pourrait être « éjecté » de la capsid sans sa dissociation complète puisque ces étapes peuvent être reproduites *in vitro* par la déplétion des ions métalliques ( $Mg^{2+}$  et  $K^+$ ) (Cotmore, Hafenstein, et Tattersall, 2010). La combinaison des résidus dans la partie C-terminale des protéines structurales chez NADL-2 (*i.e.* D378, H383, R565, se trouvant sur les boucles GH adjacentes) pourrait favoriser l'interaction avec l'un ou plusieurs cofacteurs cellulaires qui augmentent l'accessibilité du génome lors des étapes précoces de l'infection, facilitant ainsi la réplication plus précoce du génome de la souche NADL-2. L'influence de l'efficacité de la décapsidation du génome viral de diverses souches sur l'allotropisme n'est pas sans précédents. En effet, l'analyse de fragments influençant le tropisme des souches MVMi et MVMp a démontré que l'insertion d'un fragment de génome codant pour une partie des protéines structurales de la souche MVMp dans la souche lymphotrope, soit la chimère MVMp3, permettait la réplication productive dans les fibroblastes qui sont normalement restrictifs à l'infection par MVMi (Antonietti et al., 1988). L'infection des cellules permissives

au MVMI par ce virus chimérique MVMP3 est toutefois non productive. L'analyse des étapes précoces de l'infection par cette chimère a démontré que la conversion du génome en l'intermédiaire de transcription est bloquée dans les cellules d'origine lymphoïde (Previsani et al., 1997). De plus, l'incubation de virions avec des lysats de cellules lymphoïdes permet d'augmenter l'accessibilité du génome de MVMI tandis que le génome MVMP3 demeure résistant à l'activité des DNAses. Il a donc été proposé qu'un facteur cellulaire, se liant préférentiellement aux protéines VP de MVMI, provoque des changements subtils de la conformation de la capsidite permettant de libérer le génome au noyau. L'efficacité de la livraison du génome du MVM au noyau et de son amplification initiale dépendrait donc de l'origine des protéines structurales et de la cellule hôte. La dissection moléculaire des étapes de transport des virions et de la livraison du génome au noyau lors de l'infection par le PPV, actuellement à l'étude dans le laboratoire, devrait permettre de mieux définir les mécanismes régissant les différences entre les souches dans les cellules porcines, et éventuellement dans les cellules bovines.

## **4.2 Influence des protéines non-structurales**

La complexité des mécanismes influençant le tropisme des parvovirus est inhérente à la nature de ces virus. Outre la capacité codante limitée de leur génome qui les rend hautement dépendant des facteurs cellulaires tout au long de leur cycle de réplication, les protéines et le génome des parvovirus sont dotés de plusieurs fonctions chevauchantes qui sont finement régulées au cours de l'infection. Les protéines virales et cellulaires agissent de concert de sorte qu'il est souvent difficile d'attribuer un phénotype particulier à une seule et unique composante. Ainsi, les études sur l'allotropisme du MVM ont mis en évidence plusieurs mécanismes qui altèrent la réplication virale dans des types cellulaires d'origines diverses. En plus de la diminution de l'efficacité de décapsidation du génome de MVMP3 dans les cellules d'origine lymphoïde (Previsani et al., 1997), il a été démontré qu'un deuxième fragment du génome du MVMP entraîne une production accrue de la protéine NS2 au cours de l'infection de ces cellules (Colomar, Hirt, et Beard, 1998). Une étude subséquente a démontré que la production accrue de la petite protéine NS résulte de l'efficacité de l'épissage du grand intron (Choi et al., 2005). L'augmentation de NS2 dans les cellules permissives d'origine murine permet de faciliter les interactions avec la protéine Crm1, celles-ci étant impliquées dans l'assemblage (Cotmore et al., 1997) et dans l'export

nucléaire des capsides (Miller et Pintel, 2002). Les effets de la protéine NS2 dépendent toutefois de l'origine de la lignée cellulaire (Naeger, Salome, et Pintel, 1993) puisque cette protéine n'est pas essentielle à la réplication du MVM dans les cellules humaines (Cater et Pintel, 1992; Naeger, Cater, et Pintel, 1990). Les rôles de la protéine NS2 au cours de l'infection par le PPV demeurent inconnus. Cette protéine constitue donc une composante virale qui pourrait être ciblée au cours des études subséquentes.

### 4.3 Rôles du génome

L'analyse de la réplication du génome des diverses chimères a soulevé plusieurs questions. En effet, aucune corrélation simple n'a pu être établie entre l'efficacité de la réplication du génome et la présence de l'un ou de l'autre fragment des souches de PPV. Toutefois, il a été observé que la présence du fragment CR3 de Kresse (nucléotides 4025-4549) réduisait la réplication tardive du génome, la productivité de l'infection et diminuait l'infectivité de virions. D'ailleurs, dans les essais de compétitions, les chimères portant le fragment CR3 de NADL-2 étaient invariablement dominantes sur les chimères réciproques portant le segment CR3 de la souche Kresse. Bien que nous ne pouvons exclure que ces effets résultent d'une interaction des protéines structurales avec les composantes cellulaires qui influencent l'accumulation des intermédiaires de réplication du génome, le rôle du génome lui-même est à considérer. En effet, la caractérisation des éléments minimaux nécessaires à la réplication du génome du MVM a démontré que les séquences à proximité de l'extrémité droite du génome interviennent dans la régulation de la réplication (Tam et Astell, 1993). Ces auteurs ont démontré que les 140 premiers nucléotides de l'extrémité gauche peuvent être juxtaposés aux 660 derniers nucléotides, à l'extrémité droite, afin de créer un mini-génome du MVM. En présence de NS1, ce mini-génome est compétent pour la génération des intermédiaires de réplication. Deux courts fragments de l'extrémité droite (A : 4489-4636 et B 4636-4695) sont absolument requis pour la réplication dans les fibroblastes A9 murins tandis que la présence du fragment B entraîne une légère réplication dans les cellules Cos7 en l'absence du fragment A. Une première caractérisation des protéines cellulaires se liant aux fragments A et B a d'abord permis de déterminer qu'un complexe hétérodimérique se lie spécifiquement au fragment B et permet de protéger deux courtes régions de cette séquence à l'action de nucléases (Tam et Astell, 1994). Une caractérisation plus fine de cette région a démontré que trois courtes régions de l'extrémité

droite du génome du MVM constituait une origine de réplication fonctionnelle, et que la liaison coopérative de plusieurs facteurs cellulaires à proximité de ces séquences permet d'initier la réplication (Brunstein et Astell, 1997).

En absence de NS1, l'efficacité de l'initiation de la réplication du mini-génome dépend aussi de la présence ou de l'absence des composantes A et B ainsi que de la séquence répétée de 65 nucléotides du génome de la souche MVMP (par rapport à la souche MVMI), une duplication analogue à celle de 127 nucléotides trouvée dans le génome de la souche NADL-2 du PPV (par rapport à la souche Kresse) (Cossons et al., 1996). Dans ce système, en présence de la répétition, la délétion du fragment A réduit l'initiation de la réplication, tandis que la délétion supplémentaire du fragment B rétablit les niveaux de base de la réplication du génome. Le fragment A augmente donc l'initiation de la réplication de l'extrémité droite du génome alors que le fragment B semble tamponner le renforcement. Par ailleurs, la délétion de l'une des copies de la séquence répétée n'a aucun effet sur l'initiation de la réplication lorsque les fragments A et B sont présents tandis qu'elle est délétère en leur absence. Étonnamment, la présence de la séquence répétée est requise pour la réplication du génome en présence de la NS1 (Salvino et al., 1991). En effet, la délétion de la duplication, ne laissant qu'une seule copie de la séquence de 65 nucléotides, réduit de 10% et de 100% l'activité basale de la réplication du génome dans les cellules A9 et Cos7, respectivement. Ces résultats suggèrent que la liaison de la protéine NS1 au niveau des séquences répétées altère l'interaction des facteurs de réplication cellulaires avec le génome du MVM. Toutefois, les essais d'initiation de la réplication en l'absence de NS1 ont été faits avec des extraits de cellules HeLa (Cossons et al., 1996) et une différence notable a été notée dans l'ampleur de l'effet de la répétition entre les cellules A9 et Cos7 en présence de la NS1 (Salvino et al., 1991). Il est donc possible qu'une partie de ces résultats contradictoires soit due aux différences dans les facteurs cellulaires eux-mêmes ou dans leur affinité de liaison avec le génome. L'identité exacte des protéines se liant à ces fragments demeure inconnue, bien que la liaison de NS1 au niveau de la séquence répétée ait été démontrée (Cotmore, Gottlieb, et Tattersall, 2007).



## 4.4 Rôles des séquences répétées

Un parallèle peut être tiré entre l'interaction des fragments A, B et des répétitions sur la réplication du génome du MVM avec l'influence de la région CR3 des souches de PPV. En effet, le fragment A identifié chez le virus murin comprend une partie de la région codante des protéines VP. Ainsi, cette région à proximité du palindrome de droite du génome pourrait avoir une double fonction, d'une part dans la stabilisation de la structure de la capsidie et d'autre part en influençant la liaison de facteurs cellulaires impliqués dans l'initiation de la réplication du génome. Toutefois, l'organisation de la région droite du génome diffère entre le MVM et le PPV, notamment dû au fait que la répétition de 127 nucléotides débute légèrement en amont du codon terminal des VP chez le PPV, tandis que la répétition de 65 nucléotides du MVM se trouve à 182 nucléotides en aval du gène VP. L'analyse de la séquence répétée du PPV démontre toutefois la présence de duplications imparfaites internes de 56 nucléotides flanquées par les sites de restriction BstZI71 dans le génome du PPV. Ainsi, la séquence du génome de la souche Kresse porte deux de ces sites de reconnaissances alors que celle de la souche NADL-2 en compte quatre. L'interaction de ces mini-répétitions avec des composantes cellulaires pourrait altérer l'efficacité de liaison coopérative de facteurs de réplication ou d'encapsidation expliquant les différences observées dans les ratios d'infectivité des virions des souches NADL-2 et Kresse lors de l'infection des cellules porcines.

## 4.5 Rôles des contreparties cellulaires

En outre, les études chez le MVM avaient indiqué que les interactions des facteurs cellulaires avec les répétitions pourraient varier d'une cellule à l'autre tel qu'observé dans les cellules A9, Cos7 et HeLa (Astell et al., 1996; Brunstein et Astell, 1997; Cossons et al., 1996). Ceci suggère que le rôle des duplications dans le génome du PPV pourrait aussi varier dans les cellules. Ceci permettrait d'ailleurs d'expliquer la très faible réplication du génome de la souche Kresse dans les cellules G11 comparativement à la celle de la souche NADL-2, tandis que la réplication de ces souches semble équivalente dans les cellules bovines F4. Nos études préliminaires sur l'efficacité de la réplication du génome des chimères dans ces cellules (Figure Supplémentaire 1, non publiée) semblent être en accord

avec ces constatations, bien qu'une caractérisation plus complète de la réplication virale sera nécessaire pour définir le mécanisme précis.

## **5. L'étude de l'allotropisme**

### **5.1 *In vitro* vs *in vivo***

L'étude de la régulation de l'allotropisme *in vitro* permet de disséquer de nombreux mécanismes impliqués dans la réplication virale dans divers types de cellules hôtes. Ce type d'étude est particulièrement pertinent dans le cas des parvovirus puisque ceux-ci dépendent fortement des composantes cellulaires pour leur réplication. Ainsi, ces comparaisons permettent de cibler les mécanismes de réplication conservés dans toutes les lignées cellulaires à ceux qui sont plus susceptibles de varier selon la cellule. Dans nos études, la capacité de répliquer le génome viral constitue la barrière la plus importante au tropisme. Un fait à considérer est la capacité des cellules bovines F4 à pleinement supporter la réplication par les deux souches de PPV. Ces résultats suggèrent donc que les différences dans la réplication d'une souche pathogène et d'une souche atténuée ne sont pas nécessairement reproductibles d'un type cellulaire à l'autre. Cependant la capacité de réplication d'un virus en culture cellulaire n'est pas nécessairement représentative de l'efficacité de réplication au niveau d'un organisme hôte. En effet, la souche NADL-2, originalement isolée à partir de leucocytes d'un porc ne présentant aucun signe d'infection (Cutlip et Mengeling, 1975a), a été « atténuée » par passage séquentiel en culture cellulaire (Mengeling et Cutlip, 1976). Il semble donc logique que cette souche serait mieux adaptée à la réplication *in vitro*. Toutefois, la définition de l'atténuation est à considérer dans le cas des souches de PPV. En effet, la souche NADL-2 est considérée non-pathogène puisqu'elle ne traverse pas la barrière placentaire suite à l'infection de la truie (Mengeling et Cutlip, 1976; Paul et Mengeling, 1980), bien qu'elle soit pathogène lorsqu'elle est injectées *in utero*.

### **5.2 Tropisme tissulaire**

Les mécanismes expliquant l'infection transplacentaire du PPV n'ont jamais été déterminés. Une virémie transitoire est toutefois nécessaire mais insuffisante à la

transmission (Mengeling et Cutlip, 1976; Mengeling, Paul, et Brown, 1980). La transmission du virus à travers la barrière placentaire pourrait aussi se faire par transport du virus au sein des cellules immunitaires. En ce sens, il a été démontré que les macrophages alvéolaires et les lymphocytes du sang périphérique supportent bel et bien la réplication de plusieurs souches de PPV (Harding et Molitor, 1988). La réplication du virus est associée à la réduction de l'activation de ces cellules suite à un stimulus externe. Ainsi la capacité de blastogenèse des lymphocytes périphériques, tels que mesurée par l'incorporation de la  $^3\text{H}$ -thymidine suite à la stimulation, était complètement abolie par l'infection des cellules à une MOI de 1 avec la souche Kresse. L'infection par la souche NADL-2 à une MOI de 1 ne réduisait toutefois que de 25% leur capacité d'activation tandis que l'infection à une MOI de 10 l'abolissait aussi complètement. L'infection à des MOI de 0.1 n'avait toutefois pas d'effet, tel qu'il avait été précédemment démontré pour l'infection des PBMC (Paul, Mengeling, et Brown, 1979). Ainsi, les cellules immunitaires ont des sensibilités différentes aux souches de PPV. La transmission du PPV de la mère au fœtus par l'entremise des cellules immunitaires demeure toutefois spéculative.

Bien que la souche NADL-2 ne cause pas de pathologie chez le fœtus lors de l'infection de la mère, l'injection de la souche NADL-2 dans le liquide allantoïque (CCID $_{50}$   $10^{6.67}$ ) conduit à l'infection du fœtus et à la réplication virale dans de nombreux organes fœtaux, dont le cerveau, les reins, la rate et les poumons en plus du sérum et des liquides fœtaux (allantoïque et amniotique) (Cutlip et Mengeling, 1975b). Le développement de l'immunocompétence fœtale, autour du 70<sup>e</sup> jour de gestation, réduit la présence d'antigènes viraux dans les tissus. L'infection des fœtus au 56<sup>e</sup> jour de gestation a démontré un taux de mortalité de 50% (n=4) comparativement à une létalité complète lorsque les fœtus étaient exposés à 35 jours de gestation (n=4) (Mengeling et Cutlip, 1975).

Pour sa part, la souche Kresse a été identifiée à partir de divers tissus et de lésions cutanées chez le porc au cours d'une épidémie au début des années 1980 (Kresse et al., 1985). L'injection de cette souche dans la cavité amniotique ( $10^{4.5}$ PFU) au jour 40 ( $\pm 5$ ) de gestation avait un taux de mortalité de 100% à 14 jours post-infection (n=4) (Choi et al., 1987). L'injection sous-cutanée chez le fœtus au jour 75 ( $\pm 5$ ) de gestation ( $4 \times 10^{4.5}$  PFU) avait aussi un taux de mortalité de 100% au 21<sup>e</sup> jour p.i., de fortes quantités de virus et d'antigènes viraux ayant été détectés dans plusieurs organes dont le cerveau, les reins, les poumons et le foie (Choi et al., 1987). L'injection intramusculaire de fœtus au 75<sup>e</sup> jour de gestation avec la souche Kresse ( $5 \times 10^5$ FFU) entraîne la momification avant le 21<sup>e</sup> jour p.i.,

et les formes répliquatives du génome viral ont été détectées dans le foie, le cerveau, les reins, l'intestin et l'estomac (2-10% de cellules positives) (Oraveerakul, Choi, et Molitor, 1993). La deuxième composante dans la virulence élevée de la souche Kresse constitue donc sa capacité à causer la pathologie même après le développement de l'immunocompétence fœtale. Par contre, il semble que la voie d'infection joue un rôle important dans la pathogenèse virale, notamment lors de l'infection à la fin du 2<sup>e</sup> tiers de gestation. En effet, aucun des fœtus infectés directement n'a succombé à l'infection (n=11), tandis qu'un seul infecté par transmission intra-utérine (n=6) était momifié suite à l'injection de la souche Kresse ( $10^{3.5}$  CCID<sub>50</sub>) au niveau du liquide amniotique au 72<sup>e</sup> jour de gestation. Ces résultats suggèrent donc que la virulence de la souche est pas aussi élevée qu'à la première estimation (Lager, Mengeling, et Liu, 1992).

## 6. L'évolution du PPV

Puisque les mécanismes définissant la virulence des souches de PPV ne sont pas définis, que le PPV est très stable en conditions environnementales et que certaines lignées cellulaires d'origine d'espèces non-hôtes sont pleinement permissives à l'infection, le potentiel d'émergence du PPV comme un nouveau pathogène demeure une question ouverte. Il est bien établi que la prévalence d'anticorps spécifiques au PPV est forte (7.9-56.6%) dans les populations sauvages de sangliers en Europe (Montagnaro et al., 2010; Oravainen et al., 2005; Roic et al., 2005; Ruiz-Fons et al., 2006; Vengust, Valencak, et Bidovec, 2006; Vicente et al., 2002), tandis que la prévalence en Amérique semble plus faible (17% dans une population sauvage de sangliers aux États-Unis (Saliki, Rodgers, et Eskew, 1998). Les études initiales de la distribution du PPV dans les élevages de porcs domestiques en Amérique avant l'instauration de programmes de vaccination avaient démontré que la prévalence variait entre 22.7-82% (Mengeling, 1972; Mengeling, 1978; Redman, Bohl, et Ferguson, 1974). Ces études pourraient aussi expliquer la plus grande variabilité des souches isolées en Europe. En effet, l'analyse de la phylogénie de sept isolats en Allemagne a déterminé que trois d'entre eux forment un nouveau génotype ou un clade, distincts des souches nord-américaines (NADL-2 et Kresse), asiatiques (trois isolats), et brésiliennes (22 séquences partielles) (Martins Soares et al., 2003; Zimmermann et al., 2006). Cette conclusion est aussi soutenue par la comparaison des séquences de

nouveaux isolats de PPV provenant de la Chine (Shangjin, Cortey, et Segales, 2009). Étonnamment, notre comparaison des séquences de PPV provenant de quatre échantillons d'extraits pancréatiques porcins produits entre 2005 et 2009 en Amérique du Nord, a suggéré que l'évolution des souches nord-américaines était plus lente que celle observée dans les autres continents. En effet, le séquençage partiel du gène de la capsid n'a détecté aucun changement dans la région C-terminale de ces protéines par rapport à la souche Kresse, dont le génome complet a été séquencé dans notre laboratoire en 1996 et qui avait été isolée autour de 1985 (Bergeron, Hebert, et Tijssen, 1996). Cette faible variation du génome du PPV a aussi été observée dans des échantillons de concentrés du facteur VIII porcins produits entre 1994 et 2001 (Szelei et al., 2010). Ceci suggère que les souches vaccinales actuellement disponibles seraient toujours efficaces contre les isolats sauvages circulant en Amérique, ce qui pourrait expliquer la réduction dans la diversité des souches.

À l'opposé, il a récemment été démontré que l'une des souches de PPV isolée en Allemagne (27a) appartenant au deuxième génotype n'était pas efficacement neutralisée par les souches vaccinales actuelles (Jozwik et al., 2009). Cette souche hautement virulente traverse la barrière placentaire et induit la momification foetale à de très forts niveaux (28 de 33 foetus) suite à l'infection au 40<sup>e</sup> jour de gestation comparativement à la souche NADL-2 (3 de 30 foetus) (Zeeuw et al., 2007). La vaccination des animaux avant l'insémination permet toutefois d'empêcher le développement de la maladie bien qu'elle n'empêche pas la réplication virale ni l'excrétion du virus. Ainsi, les auteurs ont proposé que ce phénomène de neutralisation incomplète soit à l'origine des infections enzootiques dans les élevages porcins malgré la vaccination régulière des troupeaux (Jozwik et al., 2009). Les taux d'évolution rapide des souches européennes de PPV suggèrent qu'une surveillance accrue de la variation antigénique est méritée.

Finalement, l'étude de la phylogénie des souches de PPV n'a pas identifié de corrélation entre la virulence et la distribution des souches mais suggère toutefois que la répétition de 127 nucléotides pourrait contribuer (Shangjin, Cortey, et Segales, 2009). En effet, la majorité des souches non-pathogènes portent la duplication complète de cette région, tel qu'observé dans la souche NADL-2, tandis que les souches hautement virulentes portent la version « simple » trouvée chez Kresse. Les souches modérément virulentes portent des versions intermédiaires, avec des délétions variant entre 63 et 95 nucléotides par rapport à la duplication de 254 nucléotides. Par contre, certaines souches pathogènes (SR-1) portent des duplications complètes ou tronquées (143a), suggérant que d'autres

mécanismes influencent aussi la virulence. Ces observations sont aussi en accord avec ce que nous avons observé pour la réplication en culture cellulaire, c'est-à-dire que la répétition contribue à l'efficacité de la réplication virale mais ne peut à elle seule expliquer l'ensemble des observations.

## 7. Phylogénie et émergence

L'étude de la phylogénie de plusieurs parvovirus a révélé que ces virus pourraient évoluer par recombinaison entre diverses souches en plus des phénomènes de dérive antigénique (Shackelton et al., 2007; Simpson et al., 2002). En effet, la comparaison des séquences de variants de PPV en Allemagne a aussi identifié plusieurs discontinuités dans la linéarité de la phylogénie et propose que certains isolats auraient pu émerger par recombinaison lors d'instance de co-infections par plusieurs souches chez un animal. Ce phénomène pourrait aussi expliquer les divergences dans le degré de conservation entre les régions du génome des espèces de parvovirus de rongeurs dont les souches de MVM, le parvovirus Lull, le parvovirus murin MPV-1, -2 et -3 et le HaPV (Shackelton et al., 2007). Ces études proposent donc qu'il serait possible que les parvovirus soient sujets à des sauts antigéniques, souvent impliqués dans l'émergence de nouvelles variantes de souches virales, typifiée par le virus influenza (Smith et al., 2009). Enfin, une étude récente a démontré l'existence de parvovirus endogènes (En-PV) au sein des génomes de plusieurs espèces de mammifères (Kapoor, Simmonds, et Lipkin, 2010). L'analyse détaillée de la séquence amplifiée à partir du chromosome 5 du génome du rat a démontré que ce parvovirus endogène avait une similarité de 70% et de 65% avec les gènes *NS* et *VP* du parvovirus canin, mais seulement 35% avec les parvovirus du rat suggérant que le En-PV pourrait constituer un ancêtre lointain du genre *Parvovirus*. Aucun En-PV n'a toutefois été détecté dans le génome canin ni porcin. Cette étude démontre par contre que des événements de recombinaison entre le génome des organismes hôtes et de ceux des parvovirus sont possibles.

# Conclusion

En somme, l'étude de l'allotropisme *in vitro* du PPV présenté dans ce document a permis de tirer plusieurs conclusions sur les mécanismes qui influent sur la réplication de ce virus dans plusieurs types de lignées cellulaires. D'une part, le tropisme du PPV n'est pas déterminé à la surface cellulaire puisqu'il peut être internalisé par des mécanismes non-spécifiques, que l'infection soit permissive ou non. De plus, l'efficacité de la génération des formes répliquatives du génome viral, soit la synthèse de la matrice de transcription et l'amplification via les formes multimériques, est le principal déterminant de la permissivité des cellules. D'autre part, l'efficacité des étapes d'assemblage et d'encapsidation influe sur l'ampleur de la permissivité à l'infection par chacune des souches virales. Dans les cellules pleinement permissives à l'infection, l'interaction de différentes composantes du génome virale avec les contreparties cellulaires agit dans la régulation fine de l'infectivité virale. Et enfin, certaines lignées cellulaires provenant d'organismes autres que l'hôte naturel du virus peuvent être pleinement permissives à l'infection virale. Nos travaux ont aussi permis le développement de nombreux outils permettant l'étude plus approfondie des mécanismes de la réplication du PPV. Ainsi, les lignées cellulaires bovines présentant diverses restrictions permettront d'identifier et de distinguer les composantes cellulaires nécessaires au virus pour la complétion efficace de plusieurs étapes de son cycle de réplication. Le système de clonage sans traces permet de modifier individuellement toutes les composantes du génome afin de caractériser les différences génétiques qui influent sur la réplication de diverses souches. La banque de chimères virales que nous avons créée servira donc à la caractérisation plus fine des mécanismes moléculaires impliqués dans le tropisme du PPV dans les lignées bovines. Et enfin, les essais de compétition de réplication (Replication Fitness) permettent de comparer la contribution de divers éléments du génome à l'efficacité de la réplication au sein d'une même population de cellules lors de co-infections. Cet essai est particulièrement intéressant puisqu'il permet de mesurer rapidement la dominance de diverses chimères au cours de l'infection. D'ailleurs le développement de méthodes génétiques d'évaluation de l'aptitude à la réplication a récemment été préconisé pour la surveillance de l'évolution de divers virus, afin de permettre une meilleure anticipation de l'émergence de nouveaux pathogènes (Pepin et al., 2010).



# **Bibliographie**

Abeygunasekara, S. C., Peat, D., and Ross, C. N. (2010). Endocapillary glomerulonephritis secondary to human parvovirus B19 presenting with nephrotic syndrome: a report of two cases and a review of the literature. *Ren Fail* **32**(7), 880-3.

Adlhoch, C., Kaiser, M., Ellerbrok, H., and Pauli, G. (2010). High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virology* **7**, 171-4.

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

Agbandje, M., McKenna, R., Rossmann, M. G., Strassheim, M. L., and Parrish, C. R. (1993). Structure determination of feline panleukopenia virus empty particles. *Proteins* **16**(2), 155-71.

Ahn, J. K., Gavin, B. J., Kumar, G., and Ward, D. C. (1989). Transcriptional analysis of minute virus of mice P4 promoter mutants. *J Virol* **63**(12), 5425-39.

Ahn, J. K., Pitluk, Z. W., and Ward, D. C. (1992). The GC box and TATA transcription control elements in the P38 promoter of the minute virus of mice are necessary and sufficient for transactivation by the nonstructural protein NS1. *J Virol* **66**(6), 3776-83.

Allan, G. M., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., Botner, A., McCullough, K., Nauwynck, H., Kennedy, S., Meehan, B., and Charreyre, C. (2004). PMWS: experimental model and co-infections. *Vet Microbiol* **98**(2), 165-8.

Allander, T., Tammi, M. T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., and Andersson, B. (2005). Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(36), 12891-6.

Anderson, M. J., Davis, L. R., Hodgson, J., Jones, S. E., Murtaza, L., Pattison, J. R., Stroud, C. E., and White, J. M. (1982). Occurrence of infection with a parvovirus-like

agent in children with sickle cell anaemia during a two-year period. *J Clin Pathol* **35**(7), 744-9.

Anderson, M. J., Jones, S. E., Fisher-Hoch, S. P., Lewis, E., Hall, S. M., Bartlett, C. L., Cohen, B. J., Mortimer, P. P., and Pereira, M. S. (1983). Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease)? *Lancet* **1**(8338), 1378.

Andrews, N. C., and Faller, D. V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**(9), 2499.

Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S., and Caillet-Fauquet, P. (1997). The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* **71**(6), 4671-8.

Antonietti, J. P., Sahli, R., Beard, P., and Hirt, B. (1988). Characterization of the cell type-specific determinant in the genome of minute virus of mice. *J Virol* **62**(2), 552-7.

Astell, C. R., Liu, Q., Harris, C. E., Brunstein, J., Jindal, H. K., and Tam, P. (1996). Minute virus of mice cis-acting sequences required for genome replication and the role of the trans-acting viral protein, NS-1. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **55**, 245-85.

Astell, C. R., Mol, C. D., and Anderson, W. F. (1987). Structural and functional homology of parvovirus and papovavirus polypeptides. *J Gen Virol* **68** ( Pt 3), 885-93.

Atchison, R. W., Casto, B. C., and Hammon, W. M. (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**, 754-6.

Baldauf, A. Q., Willwand, K., Mumtsidu, E., Nuesch, J. P., and Rommelaere, J. (1997). Specific initiation of replication at the right-end telomere of the closed species of minute virus of mice replicative-form DNA. *J Virol* **71**(2), 971-80.

Ball-Goodrich, L. J., Moir, R. D., and Tattersall, P. (1991). Parvoviral target cell specificity: acquisition of fibrotropism by a mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice involves multiple amino acid substitutions within the capsid. *Virology* **184**(1), 175-86.

Ball-Goodrich, L. J., and Tattersall, P. (1992). Two amino acid substitutions within the capsid are coordinately required for acquisition of fibrotropism by the lymphotropic strain of minute virus of mice. *J Virol* **66**(6), 3415-23.

Bar, S., Daeffler, L., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (2008). Vesicular egress of non-enveloped lytic parvoviruses depends on gelsolin functioning. *PLoS Pathog* **4**(8), e1000126.

Barbis, D. P., Chang, S. F., and Parrish, C. R. (1992). Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology* **191**(1), 301-8.

Basak, S., and Turner, H. (1992). Infectious entry pathway for canine parvovirus. *Virology* **186**(2), 368-76.

Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J., and Willwand, K. (2000). Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10), 5522-7.

Bashir, T., Rommelaere, J., and Cziepluch, C. (2001). In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies. *J Virol* **75**(9), 4394-8.

Bates, R. C., Snyder, C. E., Banerjee, P. T., and Mitra, S. (1984). Autonomous parvovirus LullI encapsidates equal amounts of plus and minus DNA strands. *J Virol* **49**(2), 319-24.

Bergeron, J., Hebert, B., and Tijssen, P. (1996). Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J Virol* **70**(4), 2508-15.

Bergeron, J., Menezes, J., and Tijssen, P. (1993). Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* **197**(1), 86-98.

Binn, L. N., Lazar, E. C., Eddy, G. A., and Kajima, M. (1970). Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect Immun* **1**(5), 503-8.

Blacklow, N. R. (1975). Potentiation of an adenovirus-associated virus by herpes simplex virus type-2-transformed cells. *J Natl Cancer Inst* **54**(1), 241-4.

Blomstrom, A. L., Belak, S., Fossum, C., McKillen, J., Allan, G., Wallgren, P., and Berg, M. (2009). Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res* **146**(1-2), 125-9.

Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C., Rommelaere, J., and Salome, N. (1999). Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **73**(9), 7769-79.

Boisvert, M., Fernandes, S., and Tijssen, P. (2010). Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol* **84**(15), 7782-92.

Boschetti, N., Wyss, K., Mischler, A., Hostettler, T., and Kempf, C. (2003). Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. *Biologicals* **31**(3), 181-5.

Botto, S., Bergallo, M., Sidoti, F., Terlizzi, M. E., Astegiano, S., Ponti, R., Costa, C., and Cavallo, R. (2009). Detection of PARV4, genotypes 1 and 2, in healthy and pathological clinical specimens. *New Microbiol* **32**(2), 189-92.

Bourguignon, G. J., Tattersall, P. J., and Ward, D. C. (1976). DNA of minute virus of mice: self-priming, nonpermuted, single-stranded genome with a 5'-terminal hairpin duplex. *J Virol* **20**(1), 290-306.

Bowles, D. E., Rabinowitz, J. E., and Samulski, J. R. (2006). The genus *Dependovirus*. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 15-23. Hodder Arnold, London, UK.

Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B., and Rommelaere, J. (1990). NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* **174**(2), 576-84.

Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D. J., Rommelaere, J., and Salome, N. (1996). Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J Virol* **70**(11), 7527-34.

Brown, K. E. (2006). The genus *Erythrovirus*. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 25-45. Hodder Arnold, London, UK.

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

Brownstein, D. G., Smith, A. L., Jacoby, R. O., Johnson, E. A., Hansen, G., and Tattersall, P. (1991). Pathogenesis of infection with a virulent allotropic variant of minute virus of mice and regulation by host genotype. *Lab Invest* **65**(3), 357-64.

Brownstein, D. G., Smith, A. L., Johnson, E. A., Pintel, D. J., Naeger, L. K., and Tattersall, P. (1992). The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol* **66**(5), 3118-24.

Brunstein, J., and Astell, C. R. (1997). Analysis of the internal replication sequence indicates that there are three elements required for efficient replication of minute virus of mice minigenomes. *J Virol* **71**(12), 9087-95.

Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D., and Rose, J. A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* **40**(1), 241-7.

Burnett, E., Christensen, J., and Tattersall, P. (2001). A consensus DNA recognition motif for two KDWK transcription factors identifies flexible-length, CpG-methylation sensitive cognate binding sites in the majority of human promoters. *J Mol Biol* **314**(5), 1029-39.

Burnett, E., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2006). Segregation of a single outboard left-end origin is essential for the viability of parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **80**(21), 10879-83.

Burnett, E., and Tattersall, P. (2003). Reverse genetic system for the analysis of parvovirus telomeres reveals interactions between transcription factor binding sites in the hairpin stem. *J Virol* **77**(16), 8650-60.

Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P., and Rommelaere, J. (1990). Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *EMBO J* **9**(9), 2989-95.

Canaan, S., Zadori, Z., Ghomashchi, F., Bollinger, J., Sadilek, M., Moreau, M. E., Tijssen, P., and Gelb, M. H. (2004). Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *J Biol Chem* **279**(15), 14502-8.

Carter, B. J. (2006). Clinical development with adeno-associated virus vectors. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 499-510. Hodder Arnold, London, UK.

- Cartwright, S. F., Lucas, M., and Huck, R. A. (1969). A small haemagglutinating porcine DNA virus. I. Isolation and properties. *J Comp Pathol* **79**(3), 371-7.
- Cartwright, S. F., Lucas, M., and Huck, R. A. (1971). A small haemagglutinating porcine DNA virus. II. Biological and serological studies. *J Comp Pathol* **81**(1), 145-55.
- Caspar, D. L., and Klug, A. (1962). Physical principles in the construction of regular viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **27**, 1-24.
- Cater, J. E., and Pintel, D. J. (1992). The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol* **73** ( Pt 7), 1839-43.
- Chang, S. F., Sgro, J. Y., and Parrish, C. R. (1992). Multiple amino acids in the capsid structure of canine parvovirus coordinately determine the canine host range and specific antigenic and hemagglutination properties. *J Virol* **66**(12), 6858-67.
- Chapman, M. S., and Agbandje-McKenna, M. (2006). Atomic structure of viral particles. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 107-123. Hodder Arnold, London, U.K.
- Chapman, M. S., and Rossmann, M. G. (1993). Structure, sequence, and function correlations among parvoviruses. *Virology* **194**(2), 491-508.
- Chapman, M. S., and Rossmann, M. G. (1996). Structural refinement of the DNA-containing capsid of canine parvovirus using RSRef, a resolution-dependent stereochemically restrained real-space refinement method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **52**(Pt 1), 129-42.
- Chen, A. Y., Cheng, F., Lou, S., Luo, Y., Liu, Z., Delwart, E., Pintel, D., and Qiu, J. (2010a). Characterization of the gene expression profile of human bocavirus. *Virology* **403**(2), 145-54.



Chen, A. Y., Zhang, E. Y., Guan, W., Cheng, F., Kleiboeker, S., Yankee, T. M., and Qiu, J. (2010b). The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood* **115**(5), 1070-80.

Chen, Y. Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B. L., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1986). Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res* **46**(7), 3574-9.

Chen, Y. Q., Tuynder, M. C., Cornelis, J. J., Boukamp, P., Fusenig, N. E., and Rommelaere, J. (1989). Sensitization of human keratinocytes to killing by parvovirus H-1 takes place during their malignant transformation but does not require them to be tumorigenic. *Carcinogenesis* **10**(1), 163-7.

Cheng, L., Chen, S., Brannan, J. M., Jakana, J., Zhang, Q., Zhou, Z. H., and Zhang, J. (2004). Three-dimensional structure determination of capsid of *Aedes albopictus* C6/36 cell densovirus. *Sci China C Life Sci* **47**(3), 224-8.

Cheng, L., Chen, S., Zhou, Z. H., and Zhang, J. (2007). Structure comparisons of *Aedes albopictus* densovirus with other parvoviruses. *Sci China C Life Sci* **50**(1), 70-4.

Chieochansin, T., Simmonds, P., and Poovorawan, Y. (2010). Determination and analysis of complete coding sequence regions of new discovered human bocavirus types 2 and 3. *Arch Virol* **155**(12), 2023-8.

Choi, C., and Chae, C. (2000). Distribution of porcine parvovirus in porcine circovirus 2-infected pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome as shown by in-situ hybridization. *J Comp Pathol* **123**(4), 302-5.

Choi, C. S., Molitor, T. W., Joo, H. S., and Gunther, R. (1987). Pathogenicity of a skin isolate of porcine parvovirus in swine fetuses. *Vet Microbiol* **15**(1-2), 19-29.

Choi, E. Y., Newman, A. E., Burger, L., and Pintel, D. (2005). Replication of minute virus of mice DNA is critically dependent on accumulated levels of NS2. *J Virol* **79**(19), 12375-81.

Choi, E. Y., and Pintel, D. (2009). Splicing of the large intron present in the nonstructural gene of minute virus of mice is governed by TIA-1/TIAR binding downstream of the nonconsensus donor. *J Virol* **83**(12), 6306-11.

Chow, B. D., and Esper, F. P. (2009). The human bocaviruses: a review and discussion of their role in infection. *Clin Lab Med* **29**(4), 695-713.

Chow, B. D., Ou, Z., and Esper, F. P. (2010). Newly recognized bocaviruses (HBoV, HBoV2) in children and adults with gastrointestinal illness in the United States. *J Clin Virol* **47**(2), 143-7.

Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1995). Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. *J Virol* **69**(9), 5422-30.

Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1997a). A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. *J Virol* **71**(2), 1405-16.

Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1997b). Parvovirus initiation factor PIF: a novel human DNA-binding factor which coordinately recognizes two ACGT motifs. *J Virol* **71**(8), 5733-41.

Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1999). Two new members of the emerging KDWK family of combinatorial transcription modulators bind as a heterodimer to flexibly spaced PuCGPy half-sites. *Mol Cell Biol* **19**(11), 7741-50.

Christensen, J., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2001). Minute virus of mice initiator protein NS1 and a host KDWK family transcription factor must form a precise ternary complex with origin DNA for nicking to occur. *J Virol* **75**(15), 7009-17.

- Christensen, J., and Tattersall, P. (2002). Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. *J Virol* **76**(13), 6518-31.
- Clemens, D. L., Wolfinbarger, J. B., Mori, S., Berry, B. D., Hayes, S. F., and Bloom, M. E. (1992). Expression of Aleutian mink disease parvovirus capsid proteins by a recombinant vaccinia virus: self-assembly of capsid proteins into particles. *J Virol* **66**(5), 3077-85.
- Clemens, K. E., and Pintel, D. (1987). Minute virus of mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site. *Virology* **160**(2), 511-4.
- Clemens, K. E., and Pintel, D. J. (1988). The two transcription units of the autonomous parvovirus minute virus of mice are transcribed in a temporal order. *J Virol* **62**(4), 1448-51.
- Cohen, S., Behzad, A. R., Carroll, J. B., and Pante, N. (2006). Parvoviral nuclear import: bypassing the host nuclear-transport machinery. *J Gen Virol* **87**(Pt 11), 3209-13.
- Cohen, S., and Pante, N. (2005). Pushing the envelope: microinjection of Minute virus of mice into *Xenopus* oocytes causes damage to the nuclear envelope. *J Gen Virol* **86**(Pt 12), 3243-52.
- Colomar, M. C., Hirt, B., and Beard, P. (1998). Two segments in the genome of the immunosuppressive minute virus of mice determine the host-cell specificity, control viral DNA replication and affect viral RNA metabolism. *J Gen Virol* **79** ( Pt 3), 581-6.
- Corbau, R., Duverger, V., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (2000). Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* **278**(1), 151-67.

Corbau, R., Salom, N., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (1999). Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* **259**(2), 402-15.

Cornelis, J. J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B. L., Namba, M., and Rommelaere, J. (1988a). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol* **62**(5), 1679-86.

Cornelis, J. J., Chen, Y. Q., Spruyt, N., Duponchel, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., and Rommelaere, J. (1990). Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J Virol* **64**(6), 2537-44.

Cornelis, J. J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S. F., Tal, J., and Rommelaere, J. (1988b). Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J Virol* **62**(9), 3438-44.

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

Cossons, N., Faust, E. A., and Zannis-Hadjopoulos, M. (1996). DNA polymerase delta-dependent formation of a hairpin structure at the 5' terminal palindrome of the minute virus of mice genome. *Virology* **216**(1), 258-64.

Cossons, N., Zannis-Hadjopoulos, M., Tam, P., Astell, C. R., and Faust, E. A. (1996). The effect of regulatory sequence elements upon the initiation of DNA replication of the minute virus of mice. *Virology* **224**(1), 320-5.

Cotmore, S. F., Christensen, J., Nuesch, J. P., and Tattersall, P. (1995). The NS1 polypeptide of the murine parvovirus minute virus of mice binds to DNA sequences containing the motif [ACCA]<sub>2-3</sub>. *J Virol* **69**(3), 1652-60.

Cotmore, S. F., Christensen, J., and Tattersall, P. (2000). Two widely spaced initiator binding sites create an HMG1-dependent parvovirus rolling-hairpin replication origin. *J Virol* **74**(3), 1332-41.

Cotmore, S. F., D'Abramo A, M., Jr., Ticknor, C. M., and Tattersall, P. (1999). Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* **254**(1), 169-81.

Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M., Jr., Carbonell, L. F., Bratton, J., and Tattersall, P. (1997). The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**(2), 267-80.

Cotmore, S. F., Gottlieb, R. L., and Tattersall, P. (2007). Replication initiator protein NS1 of the parvovirus minute virus of mice binds to modular divergent sites distributed throughout duplex viral DNA. *J Virol* **81**(23), 13015-27.

Cotmore, S. F., Gunther, M., and Tattersall, P. (1989). Evidence for a ligation step in the DNA replication of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **63**(2), 1002-6.

Cotmore, S. F., Hafenstein, S., and Tattersall, P. (2010). Depletion of virion-associated divalent cations induces parvovirus minute virus of mice to eject its genome in a 3'-to-5' direction from an otherwise intact viral particle. *J Virol* **84**(4), 1945-56.

Cotmore, S. F., Nuesch, J. P., and Tattersall, P. (1992). In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer junctions. *Virology* **190**(1), 365-77.

Cotmore, S. F., Nuesch, J. P., and Tattersall, P. (1993). Asymmetric resolution of a parvovirus palindrome in vitro. *J Virol* **67**(3), 1579-89.

- Cotmore, S. F., Sturzenbecker, L. J., and Tattersall, P. (1983). The autonomous parvovirus MVM encodes two nonstructural proteins in addition to its capsid polypeptides. *Virology* **129**(2), 333-43.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1986a). The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res* **4**(3), 243-50.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1986b). Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **58**(3), 724-32.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1987). The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res* **33**, 91-174.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1988). The NS-1 polypeptide of minute virus of mice is covalently attached to the 5' termini of duplex replicative-form DNA and progeny single strands. *J Virol* **62**(3), 851-60.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1989). A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol* **63**(9), 3902-11.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1990). Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177**(2), 477-87.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1992). In vivo resolution of circular plasmids containing concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA and their subsequent replication as linear molecules. *J Virol* **66**(1), 420-31.
- Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1995). DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* **6**(5), 271-281.

Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1998). High-mobility group 1/2 proteins are essential for initiating rolling-circle-type DNA replication at a parvovirus hairpin origin. *J Virol* **72**(11), 8477-84.

Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2003). Resolution of parvovirus dimer junctions proceeds through a novel heterocruciform intermediate. *J Virol* **77**(11), 6245-54.

Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2005a). Encapsidation of minute virus of mice DNA: aspects of the translocation mechanism revealed by the structure of partially packaged genomes. *Virology* **336**(1), 100-12.

Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2005b). Genome packaging sense is controlled by the efficiency of the nick site in the right-end replication origin of parvoviruses minute virus of mice and Lull. *J Virol* **79**(4), 2287-300.

Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2006). A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses. *In "Parvoviruses"* (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 171-188. Hodder Arnold, London, UK.

Cutlip, R. C., and Mengeling, W. L. (1975a). Experimentally induced infection of neonatal swine with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **36**(08), 1179-82.

Cutlip, R. C., and Mengeling, W. L. (1975b). Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of eight- and ten-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **36**(12), 1751-4.

Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P., and Rommelaere, J. (2000). H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure. *J Virol* **74**(10), 4807-15.

Daeffler, L., Horlein, R., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (2003). Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol* **77**(23), 12466-78.

Davis, C., Segev-Amzaleg, N., Rotem, I., Mincberg, M., Amir, N., Sivan, S., Gitelman, I., and Tal, J. (2003). The P4 promoter of the parvovirus minute virus of mice is developmentally regulated in transgenic P4-LacZ mice. *Virology* **306**(2), 268-79.

Deleu, L., Fuks, F., Spitkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1998). Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells. *Mol Cell Biol* **18**(1), 409-19.

Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1999). Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* **73**(5), 3877-85.

Deleu, L., Pujol, A., Nuesch, J. P., and Rommelaere, J. (2001). Inhibition of transcription-regulating properties of nonstructural protein 1 (NS1) of parvovirus minute virus of mice by a dominant-negative mutant form of NS1. *J Gen Virol* **82**(Pt 8), 1929-34.

Denby, L., Nicklin, S. A., and Baker, A. H. (2005). Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther* **12**(20), 1534-8.

Derbyshire, J. B. (1989). The interferon sensitivity of selected porcine viruses. *Can J Vet Res* **53**(1), 52-5.

Dettwiler, S., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (1999). DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated specifically by the lambda isoform of protein kinase C. *J Virol* **73**(9), 7410-20.

Diffoot-Carlo, N., Velez-Perez, L., and de Jesus-Maldonado, I. (2005). Possible active origin of replication in the double stranded extended form of the left terminus of Lulll and its implication on the replication model of the parvovirus. *Viol J* **2**, 47-57.



Diffoot, N., Shull, B. C., Chen, K. C., Stout, E. R., Lederman, M., and Bates, R. C. (1989). Identical ends are not required for the equal encapsidation of plus- and minus-strand parvovirus Lull DNA. *J Virol* **63**(7), 3180-4.

Doerig, C., Hirt, B., Beard, P., and Antonietti, J. P. (1988). Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter. *J Gen Virol* **69** ( Pt 10), 2563-73.

Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D., and Danos, O. (2001). Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J Virol* **75**(4), 1824-33.

Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J., and Engelhardt, J. F. (2000). Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J Clin Invest* **105**(11), 1573-87.

Dunne, H. W., Gobble, J. L., Hokanson, J. F., Kradel, D. C., and Bubash, G. R. (1965). Porcine reproductive failure associated with a newly identified "SMEDI" group of picorna viruses. *Am J Vet Res* **26**(115), 1284-97.

Dupressoir, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N., and Rommelaere, J. (1989). Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **49**(12), 3203-8.

Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J., and Salome, N. (2002). The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* **76**(20), 10307-19.

Engelsma, D., Valle, N., Fish, A., Salome, N., Almendral, J. M., and Fornerod, M. (2008). A supraphysiological nuclear export signal is required for parvovirus nuclear export. *Mol Biol Cell* **19**(6), 2544-52.

Engers, H. D., Louis, J. A., Zubler, R. H., and Hirt, B. (1981). Inhibition of T cell-mediated functions by MVM(i), a parvovirus closely related to minute virus of mice. *J Immunol* **127**(6), 2280-5.

Faisst, S., Perros, M., Deleu, L., Spruyt, N., and Rommelaere, J. (1994). Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* **202**(1), 466-70.

Faisst, S., Schlehofer, J. R., and zur Hausen, H. (1989). Transformation of human cells by oncogenic viruses supports permissiveness for parvovirus H-1 propagation. *J Virol* **63**(5), 2152-8.

Faisst, S. R., Faisst, S., Grangette, C., Schlehofer, J. R., and Rommelaere, J. (1993). NF kappa B upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMp. *Virology* **197**(2), 770-3.

Fan, M. M., Tamburic, L., Shippam-Brett, C., Zagrodny, D. B., and Astell, C. R. (2001). The small 11-kDa protein from B19 parvovirus binds growth factor receptor-binding protein 2 in vitro in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner. *Virology* **291**(2), 285-91.

Farr, G. A., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (2006). VP2 cleavage and the leucine ring at the base of the fivefold cylinder control pH-dependent externalization of both the VP1 N terminus and the genome of minute virus of mice. *J Virol* **80**(1), 161-71.

Farr, G. A., and Tattersall, P. (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.

Farr, G. A., Zhang, L. G., and Tattersall, P. (2005). Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(47), 17148-53.

Fattah, F. J., Lichter, N. F., Fattah, K. R., Oh, S., and Hendrickson, E. A. (2008). Ku70, an essential gene, modulates the frequency of rAAV-mediated gene targeting in human somatic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(25), 8703-8.

Faust, E. A., Brudzynska, K., and Morgan, J. (1989). Characterization of novel populations of MVM virions containing covalent DNA-protein complexes. *Virology* **168**(1), 128-37.

Fernandes, S., and Tijssen, P. (2009). Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA. *Anal Biochem* **385**(1), 171-3.

Fryer, J. F., Delwart, E., Bernardin, F., Tuke, P. W., Lukashov, V. V., and Baylis, S. A. (2007a). Analysis of two human parvovirus PARV4 genotypes identified in human plasma for fractionation. *J Gen Virol* **88**(Pt 8), 2162-7.

Fryer, J. F., Delwart, E., Hecht, F. M., Bernardin, F., Jones, M. S., Shah, N., and Baylis, S. A. (2007b). Frequent detection of the parvoviruses, PARV4 and PARV5, in plasma from blood donors and symptomatic individuals. *Transfusion* **47**(6), 1054-61.

Fryer, J. F., Hubbard, A. R., and Baylis, S. A. (2007). Human parvovirus PARV4 in clotting factor VIII concentrates. *Vox Sang* **93**(4), 341-7.

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

Fuks, F., Deleu, L., Dinsart, C., Rommelaere, J., and Faisst, S. (1996). ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J Virol* **70**(3), 1331-9.

Gardiner, E. M., and Tattersall, P. (1988a). Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J Virol* **62**(5), 1713-22.

Gardiner, E. M., and Tattersall, P. (1988b). Mapping of the fibrotropic and lymphotropic host range determinants of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **62**(8), 2605-13.

Gilbert, L., Valilehto, O., Kirjavainen, S., Tikka, P. J., Mellett, M., Kapyla, P., Oker-Blom, C., and Vuento, M. (2005). Expression and subcellular targeting of canine parvovirus capsid proteins in baculovirus-transduced NLFK cells. *FEBS Lett* **579**(2), 385-92.

Govindasamy, L., Hueffer, K., Parrish, C. R., and Agbandje-McKenna, M. (2003). Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants. *J Virol* **77**(22), 12211-21.

Green, M. R., and Roeder, R. G. (1980a). Definition of a novel promoter for the major adenovirus-associated virus mRNA. *Cell* **22**(1 Pt 1), 231-42.

Green, M. R., and Roeder, R. G. (1980b). Transcripts of the adeno-associated virus genome: mapping of the major RNAs. *J Virol* **36**(1), 79-92.

Grekova, S., Zawatzky, R., Horlein, R., Cziepluch, C., Mincberg, M., Davis, C., Rommelaere, J., and Daeffler, L. (2010). Activation of an antiviral response in normal but not transformed mouse cells: a new determinant of minute virus of mice oncotropism. *J Virol* **84**(1), 516-31.

Gu, M. L., Chen, F. X., and Rhode, S. L. (1992). Parvovirus H-1 P38 promoter requires the trans-activation region (tar), an SP1 site, and a TATA box for full activity. *Virology* **187**(1), 10-7.

Gu, M. L., and Rhode, S. L. (1992). Trans-activation of H-1 parvovirus P38 promoter is correlated with increased binding of cellular protein(s) to the trans-activation responsive element (tar). *Virology* **190**(1), 116-23.

Gu, Z., Plaza, S., Perros, M., Cziepluch, C., Rommelaere, J., and Cornelis, J. J. (1995). NF-Y controls transcription of the minute virus of mice P4 promoter through interaction with an unusual binding site. *J Virol* **69**(1), 239-46.

Guetta, E., Minchberg, M., Mousset, S., Bertinchamps, C., Rommelaere, J., and Tal, J. (1990). Selective killing of transformed rat cells by minute virus of mice does not require infectious virus production. *J Virol* **64**(1), 458-62.

Guo, H., Zhang, J., and Hu, Y. (2000). Complete sequence and organization of *Periplaneta fuliginosa* densovirus genome. *Acta Virol* **44**(6), 315-22.

Han, S. P., Tang, Y. H., and Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* **430**(3), 379-92.

Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A. (2001). Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. *J Virol* **75**(9), 4080-90.

Hanson, N. D., and Rhode, S. L., 3rd (1991). Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J Virol* **65**(8), 4325-33.

Harbison, C. E., Chiorini, J. A., and Parrish, C. R. (2008). The parvovirus capsid odyssey: from the cell surface to the nucleus. *Trends Microbiol* **16**(5), 208-14.

Harbison, C. E., Lyi, S. M., Weichert, W. S., and Parrish, C. R. (2009). Early steps in cell infection by parvoviruses: host-specific differences in cell receptor binding but similar endosomal trafficking. *J Virol* **83**(20), 10504-14.

Harding, M. J., and Molitor, T. W. (1988). Porcine parvovirus: replication in and inhibition of selected cellular functions of swine alveolar macrophages and peripheral blood lymphocytes. *Arch Virol* **101**(1-2), 105-17.

Harris, C. E., Boden, R. A., and Astell, C. R. (1999). A novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein interacts with NS1 of the minute virus of mice. *J Virol* **73**(1), 72-80.

Haut, D. D., and Pintel, D. J. (1998). Intron definition is required for excision of the minute virus of mice small intron and definition of the upstream exon. *J Virol* **72**(3), 1834-43.

Haut, D. D., and Pintel, D. J. (1999). Inclusion of the NS2-specific exon in minute virus of mice mRNA is facilitated by an intronic splicing enhancer that affects definition of the downstream small intron. *Virology* **258**(1), 84-94.

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

Hoelzer, K., and Parrish, C. R. (2010). The emergence of parvoviruses of carnivores. *Vet Res* **41**(6), 39-51.

Hoelzer, K., Shackelton, L. A., Parrish, C. R., and Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic analysis reveals the emergence, evolution and dispersal of carnivore parvoviruses. *J Gen Virol* **89**(Pt 9), 2280-9.

Horiuchi, M., Ishiguro, N., Goto, H., and Shinagawa, M. (1992). Characterization of the stage(s) in the virus replication cycle at which the host-cell specificity of the feline parvovirus subgroup is regulated in canine cells. *Virology* **189**(2), 600-8.

Hueffer, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., and Parrish, C. R. (2003). Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. *J Virol* **77**(18), 10099-105.

- Hueffer, K., and Parrish, C. R. (2003). Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol* **6**(4), 392-8.
- Itah, R., Tal, J., and Davis, C. (2004). Host cell specificity of minute virus of mice in the developing mouse embryo. *J Virol* **78**(17), 9474-86.
- Jennings, K., Miyamae, T., Traister, R., Marinov, A., Katakura, S., Sowders, D., Trapnell, B., Wilson, J. M., Gao, G., and Hirsch, R. (2005). Proteasome inhibition enhances AAV-mediated transgene expression in human synoviocytes in vitro and in vivo. *Mol Ther* **11**(4), 600-7.
- Jindal, H. K., Yong, C. B., Wilson, G. M., Tam, P., and Astell, C. R. (1994). Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions. *J Biol Chem* **269**(5), 3283-9.
- Johnson, R. H., and Collings, D. F. (1969). Experimental infection of piglets and pregnant gilts with a parvovirus. *Vet Rec* **85**(16), 446-7.
- Johnson, R. H., and Collings, D. F. (1971). Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. *Res Vet Sci* **12**(6), 570-2.
- Jones, M. S., Kapoor, A., Lukashov, V. V., Simmonds, P., Hecht, F., and Delwart, E. (2005). New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* **79**(13), 8230-6.
- Jongeneel, C. V., Sahli, R., McMaster, G. K., and Hirt, B. (1986). A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* **59**(3), 564-73.
- Joo, H. S., Donaldson-Wood, C. R., and Johnson, R. H. (1976). Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. *Arch Virol* **51**(1-2), 123-9.

Joo, H. S., Donaldson-Wood, C. R., Johnson, R. H., and Campbell, R. S. (1977). Pathogenesis of porcine parvovirus infection: pathology and immunofluorescence in the foetus. *J Comp Pathol* **87**(3), 383-91.

Jozwik, A., Manteufel, J., Selbitz, H. J., and Truyen, U. (2009). Vaccination against porcine parvovirus protects against disease, but does not prevent infection and virus shedding after challenge infection with a heterologous virus strain. *J Gen Virol* **90**(Pt 10), 2437-41.

Kang, B. Y., You, H., Bandyopadhyay, S., Agrawal, N., Melchert, R. B., Basnakian, A. G., Liu, Y., and Hermonat, P. L. (2009). Cervical cancer isolate PT3, super-permissive for adeno-associated virus replication, over-expresses DNA polymerase delta, PCNA, RFC and RPA. *BMC Microbiol* **9**, 79-89.

Kapoor, A., Mehta, N., Esper, F., Poljsak-Prijatelj, M., Quan, P. L., Qaisar, N., Delwart, E., and Lipkin, W. I. (2010). Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas. *PLoS One* **5**(7), e11948.

Kapoor, A., Simmonds, P., and Lipkin, I. W. (2010). Discovery and Characterization of Mammalian Endogenous Parvoviruses. *J. Virol* **84**(24), 12628-35.

Kapoor, A., Slikas, E., Simmonds, P., Chieochansin, T., Naeem, A., Shaukat, S., Alam, M. M., Sharif, S., Angez, M., Zaidi, S., and Delwart, E. (2009). A newly identified bocavirus species in human stool. *J Infect Dis* **199**(2), 196-200.

Kaufmann, B., Bowman, V. D., Li, Y., Szelei, J., Waddell, P. J., Tijssen, P., and Rossmann, M. G. (2010). Structure of *Penaeus stylirostris* Densovirus, a Shrimp Pathogen. *J Virol* **84**(21), 11286-96.

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



Kerr, J. R., and Modrow, S. (2006). Human and primate erthrovirus infections and associated disease. *In* "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 385-416. Hodder Arnold, London, UK.

Kontou, M., Govindasamy, L., Nam, H. J., Bryant, N., Llamas-Saiz, A. L., Foces-Foces, C., Hernando, E., Rubio, M. P., McKenna, R., Almendral, J. M., and Agbandje-McKenna, M. (2005). Structural determinants of tissue tropism and in vivo pathogenicity for the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **79**(17), 10931-43.

Kotin, R. M., Menninger, J. C., Ward, D. C., and Berns, K. I. (1991). Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics* **10**(3), 831-4.

Kotin, R. M., Siniscalco, M., Samulski, R. J., Zhu, X. D., Hunter, L., Laughlin, C. A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K. I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(6), 2211-5.

Kozak, M. (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(7), 2662-2666.

Krady, J. K., and Ward, D. C. (1995). Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol Cell Biol* **15**(1), 524-33.

Krakovka, S., Ellis, J. A., Meehan, B., Kennedy, S., McNeilly, F., and Allan, G. (2000). Viral wasting syndrome of swine: experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic swine by coinfection with porcine circovirus 2 and porcine parvovirus. *Vet Pathol* **37**(3), 254-63.

Kresse, J. I., Taylor, W. D., Stewart, W. W., and Eernisse, K. A. (1985). Parvovirus infection in pigs with necrotic and vesicle-like lesions. *Vet Microbiol* **10**(6), 525-31.

Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S., and Yoshida, M. (1998). Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res* **242**(2), 540-7.

Kuntz-Simon, G., Bashir, T., Rommelaere, J., and Willwand, K. (1999). Neoplastic transformation-associated stimulation of the in vitro resolution of concatemer junction fragments from minute virus of mice DNA. *J Virol* **73**(3), 2552-8.

Labieniec-Pintel, L., and Pintel, D. (1986). The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J Virol* **57**(3), 1163-7.

Lachmann, S., Bar, S., Rommelaere, J., and Nuesch, J. P. (2008). Parvovirus interference with intracellular signalling: mechanism of PKC $\zeta$  activation in MVM-infected A9 fibroblasts. *Cell Microbiol* **10**(3), 755-69.

Lachmann, S., Rommeleare, J., and Nuesch, J. P. (2003). Novel PKC $\zeta$  is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice. *J Virol* **77**(14), 8048-60.

Lager, K. M., Mengeling, W. L., and Liu, W. (1992). Comparison of the virulence of two isolates of porcine parvovirus in 72-day-old porcine fetuses. *J Vet Diagn Invest* **4**(3), 245-8.

Lau, S. K., Woo, P. C., Tse, H., Fu, C. T., Au, W. K., Chen, X. C., Tsoi, H. W., Tsang, T. H., Chan, J. S., Tsang, D. N., Li, K. S., Tse, C. W., Ng, T. K., Tsang, O. T., Zheng, B. J., Tam, S., Chan, K. H., Zhou, B., and Yuen, K. Y. (2008). Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J Gen Virol* **89**(Pt 8), 1840-8.

Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1986). Parvovirus H-1 expression: mapping of the abundant cytoplasmic transcripts and identification of promoter sites and overlapping transcription units. *J Virol* **58**(2), 271-80.

Legendre, D., and Rommelaere, J. (1992). Terminal regions of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice are involved in cytotoxicity and promoter trans inhibition. *J Virol* **66**(10), 5705-13.

Legendre, D., and Rommelaere, J. (1994). Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **68**(12), 7974-85.

Legrand, C., Mousset, S., Salome, N., and Rommelaere, J. (1992). Cooperation of oncogenes in cell transformation and sensitization to killing by the parvovirus minute virus of mice. *J Gen Virol* **73** ( Pt 8), 2003-9.

Legrand, C., Rommelaere, J., and Caillet-Fauquet, P. (1993). MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology* **195**(1), 149-55.

Li, X., and Rhode, S. L., 3rd (1990). Mutation of lysine 405 to serine in the parvovirus H-1 NS1 abolishes its functions for viral DNA replication, late promoter trans activation, and cytotoxicity. *J Virol* **64**(10), 4654-60.

Li, X., and Rhode, S. L., 3rd (1991). Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro. *Virology* **184**(1), 117-30.

Li, X., and Rhode, S. L., 3rd (1993). The parvovirus H-1 NS2 protein affects viral gene expression through sequences in the 3' untranslated region. *Virology* **194**(1), 10-9.

Llamas-Saiz, A. L., Agbandje-McKenna, M., Parker, J. S., Wahid, A. T., Parrish, C. R., and Rossmann, M. G. (1996). Structural analysis of a mutation in canine parvovirus which controls antigenicity and host range. *Virology* **225**(1), 65-71.

- Lochelt, M., Haas, L., and Kaaden, O. R. (1990). The monomer covalently closed linear replicative form DNA is an intermediate of Aleutian disease parvovirus DNA replication. *J Gen Virol* **71** ( Pt 3), 541-9.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Agbandje-McKenna, M., and Almendral, J. M. (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., Ramirez, J. C., Garcia, J., and Almendral, J. M. (2002). Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* **76**(14), 7049-59.
- Lopez-Bueno, A., Rubio, M. P., Bryant, N., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., and Almendral, J. M. (2006). Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* **80**(3), 1563-73.
- Lopez-Bueno, A., Valle, N., Gallego, J. M., Perez, J., and Almendral, J. M. (2004). Enhanced cytoplasmic sequestration of the nuclear export receptor CRM1 by NS2 mutations developed in the host regulates parvovirus fitness. *J Virol* **78**(19), 10674-84.
- Lopez-Guerrero, J. A., Rayet, B., Tuynder, M., Rommelaere, J., and Dinsart, C. (1997). Constitutive activation of U937 promonocytic cell clones selected for their resistance to parvovirus H-1 infection. *Blood* **89**(5), 1642-53.
- Lopez de Turiso, J. A., Cortes, E., Martinez, C., Ruiz de Ybanez, R., Simarro, I., Vela, C., and Casal, I. (1992). Recombinant vaccine for canine parvovirus in dogs. *J Virol* **66**(5), 2748-53.
- Lorson, C., Burger, L. R., Mouw, M., and Pintel, D. J. (1996). Efficient transactivation of the minute virus of mice P38 promoter requires upstream binding of NS1. *J Virol* **70**(2), 834-42.

Lorson, C., Pearson, J., Burger, L., and Pintel, D. J. (1998). An Sp1-binding site and TATA element are sufficient to support full transactivation by proximally bound NS1 protein of minute virus of mice. *Virology* **240**(2), 326-37.

Lorson, C., and Pintel, D. J. (1997). Characterization of the minute virus of mice P38 core promoter elements. *J Virol* **71**(9), 6568-75.

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

Mani, B., Baltzer, C., Valle, N., Almendral, J. M., Kempf, C., and Ros, C. (2006). Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J Virol* **80**(2), 1015-24.

Maroto, B., Ramirez, J. C., and Almendral, J. M. (2000). Phosphorylation status of the parvovirus minute virus of mice particle: mapping and biological relevance of the major phosphorylation sites. *J Virol* **74**(23), 10892-902.

Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R., and Almendral, J. M. (2004). Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface. *J Virol* **78**(19), 10685-94.

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

Martins Soares, R., Cortez, A., Heinemann, M. B., Sakamoto, S. M., Martins, V. G., Bacci, M., Jr., De Campos Fernandes, F. M., and Richtzenhain, L. J. (2003). Genetic variability of porcine parvovirus isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J Gen Virol* **84**(Pt 6), 1505-15.

Mayo, M. A. (2005). Changes to virus taxonomy 2004. *Archives of Virology* **150**, 189-198.

Mengeling, W. L. (1972). Porcine parvovirus: properties and prevalence of a strain isolated in the United States. *Am J Vet Res* **33**(11), 2239-48.

Mengeling, W. L. (1978). Prevalence of porcine parvovirus-induced reproductive failure: an abattoir study. *J Am Vet Med Assoc* **172**(11), 1291-4.

Mengeling, W. L., and Cutlip, R. C. (1975). Pathogenesis of in utero infection: experimental infection of five-week-old porcine fetuses with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **36**(08), 1173-7.

Mengeling, W. L., and Cutlip, R. C. (1976). Reproductive disease experimentally induced by exposing pregnant gilts to porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **37**(12), 1393-400.

Mengeling, W. L., Cutlip, R. C., Wilson, R. A., Parks, J. B., and Marshall, R. F. (1975). Fetal mummification associated with porcine parvovirus infection. *J Am Vet Med Assoc* **166**(10), 993-5.

Mengeling, W. L., and Paul, P. S. (1981). Reproductive performance of gilts exposed to porcine parvovirus at 56 or 70 days of gestation. *Am J Vet Res* **42**(12), 2074-6.

Mengeling, W. L., and Paul, P. S. (1986). Interepizootic survival of porcine parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* **188**(11), 1293-5.

Mengeling, W. L., Paul, P. S., and Brown, T. T. (1980). Transplacental infection and embryonic death following maternal exposure to porcine parvovirus near the time of conception. *Arch Virol* **65**(1), 55-62.

Mengeling, W. L., Pejsak, Z., and Paul, P. S. (1984). Biological assay of attenuated strain NADL-2 and virulent strain NADL-8 of porcine parvovirus. *Am J Vet Res* **45**(11), 2403-7.

Miller, C. L., and Pintel, D. J. (2001). The NS2 protein generated by the parvovirus minute virus of mice is degraded by the proteasome in a manner independent of ubiquitin chain elongation or activation. *Virology* **285**(2), 346-55.

Miller, C. L., and Pintel, D. J. (2002). Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J Virol* **76**(7), 3257-66.

Molitor, T. W., Joo, H. S., and Collett, M. S. (1983). Porcine parvovirus: virus purification and structural and antigenic properties of virion polypeptides. *J Virol* **45**(2), 842-54.

Molitor, T. W., Joo, H. S., and Collett, M. S. (1985). Identification and characterization of a porcine parvovirus nonstructural polypeptide. *J Virol* **55**(3), 554-9.

Montagnaro, S., Sasso, S., De Martino, L., Longo, M., Iovane, V., Ghiurmino, G., Pisanelli, G., Nava, D., Baldi, L., and Pagnini, U. (2010). Prevalence of antibodies to selected viral and bacterial pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Campania Region, Italy. *J Wildl Dis* **46**(1), 316-9.

Morgan, W. R., and Ward, D. C. (1986). Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs. *J Virol* **60**(3), 1170-4.

Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet-Fauquet, P., and Rommelaere, J. (1994). The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol* **68**(10), 6446-53.

Mousset, S., and Rommelaere, J. (1988). Susceptibility to parvovirus Minute virus of mice as a function of the degree of host cell transformation: little effect of simian virus 40 infection and phorbol ester treatment. *Virus Res* **9**(2-3), 107-17.

Mouw, M., and Pintel, D. J. (1998). Amino acids 16-275 of minute virus of mice NS1 include a domain that specifically binds (ACCA)<sub>2-3</sub>-containing DNA. *Virology* **251**(1), 123-31.

Naeger, L. K., Cater, J., and Pintel, D. J. (1990). The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J Virol* **64**(12), 6166-75.

Naeger, L. K., Salome, N., and Pintel, D. J. (1993). NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol* **67**(2), 1034-43.

Nakamura, Y., Gojobori, T., and Ikemura, T. (2000). Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucleic Acids Res* **28**(1), 292.

Nam, H. J., Gurda-Whitaker, B., Gan, W. Y., Ilaria, S., McKenna, R., Mehta, P., Alvarez, R. A., and Agbandje-McKenna, M. (2006). Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J Biol Chem* **281**(35), 25670-7.

Nicolas, A., Alazard-Dany, N., Biollay, C., Arata, L., Jolinon, N., Kuhn, L., Ferro, M., Weller, S. K., Epstein, A. L., Salvetti, A., and Greco, A. Identification of replication-associated factors in herpes simplex virus type 1-induced adeno-associated virus type 2 replication compartments. *J Virol* **84**(17), 8871-87.

Nüesch, J. P. (2006). Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 275-289. Hodder Arnold, London, UK.



Nuesch, J. P., Bar, S., Lachmann, S., and Rommelaere, J. (2009). Ezrin-radixin-moesin family proteins are involved in parvovirus replication and spreading. *J Virol* **83**(11), 5854-63.

Nuesch, J. P., Christensen, J., and Rommelaere, J. (2001). Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1. *J Virol* **75**(13), 5730-9.

Nuesch, J. P., Corbau, R., Tattersall, P., and Rommelaere, J. (1998a). Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated In vitro by the phosphorylation state of the polypeptide. *J Virol* **72**(10), 8002-12.

Nuesch, J. P., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1992). Expression of functional parvoviral NS1 from recombinant vaccinia virus: effects of mutations in the nucleotide-binding motif. *Virology* **191**(1), 406-16.

Nuesch, J. P., Cotmore, S. F., and Tattersall, P. (1995). Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. *Virology* **209**(1), 122-35.

Nuesch, J. P., Dettwiler, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (1998b). Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J Virol* **72**(12), 9966-77.

Nuesch, J. P., Lachmann, S., Corbau, R., and Rommelaere, J. (2003). Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKC $\lambda$  in vivo. *J Virol* **77**(1), 433-42.

Nuesch, J. P., Lachmann, S., and Rommelaere, J. (2005). Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* **331**(1), 159-74.

Nuesch, J. P., and Rommelaere, J. (2006). NS1 interaction with CKII  $\alpha$ : novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity. *J Virol* **80**(10), 4729-39.

Nuesch, J. P., and Rommelaere, J. (2007). A viral adaptor protein modulating casein kinase II activity induces cytopathic effects in permissive cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30), 12482-7.

Nuesch, J. P., and Tattersall, P. (1993). Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology* **196**(2), 637-51.

Ohshima, T., Nakajima, T., Oishi, T., Imamoto, N., Yoneda, Y., Fukamizu, A., and Yagami, K. (1999). CRM1 mediates nuclear export of nonstructural protein 2 from parvovirus minute virus of mice. *Biochem Biophys Res Commun* **264**(1), 144-50.

Oleksiewicz, M. B., and Alexandersen, S. (1997). S-phase-dependent cell cycle disturbances caused by Aleutian mink disease parvovirus. *J Virol* **71**(2), 1386-96.

Op De Beeck, A., Anouja, F., Mousset, S., Rommelaere, J., and Caillet-Fauquet, P. (1995). The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ* **6**(7), 781-7.

Op De Beeck, A., and Caillet-Fauquet, P. (1997a). The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? *J Virol* **71**(7), 5323-9.

Op De Beeck, A., and Caillet-Fauquet, P. (1997b). Viruses and the cell cycle. *Prog Cell Cycle Res* **3**, 1-19.

Op De Beeck, A., Sobczak-Thepot, J., Sirma, H., Bourgain, F., Brechot, C., and Caillet-Fauquet, P. (2001). NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *J Virol* **75**(22), 11071-8.

Oravainen, J., Heinonen, M., Tast, A., Virolainen, J., and Peltoniemi, O. (2005). High porcine parvovirus antibodies in sow herds: prevalence and associated factors. *Reprod Domest Anim* **40**(1), 57-61.

Oraveerakul, K., Choi, C. S., and Molitor, T. W. (1992). Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J Virol* **66**(2), 715-22.

Oraveerakul, K., Choi, C. S., and Molitor, T. W. (1993). Tissue tropisms of porcine parvovirus in swine. *Arch Virol* **130**(3-4), 377-89.

Paglino, J., Burnett, E., and Tattersall, P. (2007). Exploring the contribution of distal P4 promoter elements to the oncoselectivity of Minute Virus of Mice. *Virology* **361**(1), 174-84.

Paradiso, P. R., Williams, K. R., and Costantino, R. L. (1984). Mapping of the amino terminus of the H-1 parvovirus major capsid protein. *J Virol* **52**(1), 77-81.

Parker, J. S., Murphy, W. J., Wang, D., O'Brien, S. J., and Parrish, C. R. (2001). Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol* **75**(8), 3896-902.

Parker, J. S., and Parrish, C. R. (1997). Canine parvovirus host range is determined by the specific conformation of an additional region of the capsid. *J Virol* **71**(12), 9214-22.

Parker, J. S., and Parrish, C. R. (2000). Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J Virol* **74**(4), 1919-30.

Parrish, C. R. (2010). Structures and Functions of Parvovirus Capsids and the Process of Cell Infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* **343**, 149-76.

Parrish, C. R., Aquadro, C. F., and Carmichael, L. E. (1988). Canine host range and a specific epitope map along with variant sequences in the capsid protein gene of

canine parvovirus and related feline, mink, and raccoon parvoviruses. *Virology* **166**(2), 293-307.

Parrish, C. R., and Carmichael, L. E. (1986). Characterization and recombination mapping of an antigenic and host range mutation of canine parvovirus. *Virology* **148**(1), 121-32.

Parrish, C. R., Leathers, C. W., Pearson, R., and Gorham, J. R. (1987). Comparisons of feline panleukopenia virus, canine parvovirus, raccoon parvovirus, and mink enteritis virus and their pathogenicity for mink and ferrets. *Am J Vet Res* **48**(10), 1429-35.

Paul, P. S., and Mengeling, W. L. (1980). Evaluation of a modified live-virus vaccine for the prevention of porcine parvovirus-induced reproductive disease in swine. *Am J Vet Res* **41**(12), 2007-11.

Paul, P. S., Mengeling, W. L., and Brown, T. T., Jr. (1979). Replication of porcine parvovirus in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and peritoneal macrophages. *Infect Immun* **25**(3), 1003-7.

Pemberton, L. F., and Paschal, B. M. (2005). Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**(3), 187-98.

Pepin, K. M., Lass, S., Pulliam, J. R., Read, A. F., and Lloyd-Smith, J. O. (2010). Identifying genetic markers of adaptation for surveillance of viral host jumps. *Nat Rev Microbiol* **8**(11), 802-13.

Perros, M., Deleu, L., Vanacker, J. M., Kherrouche, Z., Spruyt, N., Faisst, S., and Rommelaere, J. (1995). Upstream CREs participate in the basal activity of minute virus of mice promoter P4 and in its stimulation in ras-transformed cells. *J Virol* **69**(9), 5506-15.

Perros, M., Fuks, F., Kherrouche, Z., and Rommelaere, J. (1999). Atypical nucleoprotein complexes mediate CRE-dependent regulation of the early promoter of minute virus of mice. *J Gen Virol* **80** ( Pt 12), 3267-72.

Pintel, D., Dadachanji, D., Astell, C. R., and Ward, D. C. (1983). The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Res* **11**(4), 1019-38.

Pintel, D. J., Gersappe, A., Haut, D., and Pearson, J. (1995). Determinants that govern alternative splicing of parvovirus pre-mRNAs. *Seminars in Virology* **6**(5), 283-290.

Pitluk, Z. W., and Ward, D. C. (1991). Unusual Sp1-GC box interaction in a parvovirus promoter. *J Virol* **65**(12), 6661-70.

Previsani, N., Fontana, S., Hirt, B., and Beard, P. (1997). Growth of the parvovirus minute virus of mice MVMP3 in EL4 lymphocytes is restricted after cell entry and before viral DNA amplification: cell-specific differences in virus uncoating in vitro. *J Virol* **71**(10), 7769-80.

Pritchard, C., Patton, J. T., Bates, R. C., and Stout, E. R. (1978). Replication of nondefective parvoviruses: lack of a virion-associated DNA polymerase. *J Virol* **28**(1), 20-7.

Pujol, A., Deleu, L., Nuesch, J. P., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C., and Rommelaere, J. (1997). Inhibition of parvovirus minute virus of mice replication by a peptide involved in the oligomerization of nonstructural protein NS1. *J Virol* **71**(10), 7393-403.

Qiu, J., Cheng, F., Burger, L. R., and Pintel, D. (2006a). The transcription profile of Aleutian mink disease virus in CRFK cells is generated by alternative processing of pre-mRNAs produced from a single promoter. *J Virol* **80**(2), 654-62.

Qiu, J., Yoto, Y., Tullis, G., and Pintel, D. J. (2006b). Parvovirus RNA processing strategies. *In* "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 253-273. Hodder Arnold, London, UK.

Rayet, B., Lopez-Guerrero, J. A., Rommelaere, J., and Dinsart, C. (1998). Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* **72**(11), 8893-903.

Redman, D. R., Bohl, E. H., and Ferguson, L. C. (1974). Porcine parvovirus: natural and experimental infections of the porcine fetus and prevalence in mature swine. *Infect Immun* **10**(4), 718-23.

Reed, A. P., Jones, E. V., and Miller, T. J. (1988). Nucleotide sequence and genome organization of canine parvovirus. *J Virol* **62**(1), 266-76.

Rhode, S. L., 3rd (1977). Replication process of the parvovirus H-1. IX. Physical mapping studies of the H-1 genome. *J Virol* **22**(2), 446-58.

Rhode, S. L., 3rd (1985). trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* **55**(3), 886-9.

Rhode, S. L., 3rd (1989). Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein. *J Virol* **63**(10), 4249-56.

Rhode, S. L., 3rd, and Klaassen, B. (1982). DNA sequence of the 5' terminus containing the replication origin of parvovirus replicative form DNA. *J Virol* **41**(3), 990-9.

Rhode, S. L., 3rd, and Paradiso, P. R. (1989). Parvovirus replication in normal and transformed human cells correlates with the nuclear translocation of the early protein NS1. *J Virol* **63**(1), 349-55.

Rhode, S. L., 3rd, and Richard, S. M. (1987). Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J Virol* **61**(9), 2807-15.

Ridpath, J. F., and Mengeling, W. L. (1988). Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res* **10**(1), 17-27.

Riolobos, L., Reguera, J., Mateu, M. G., and Almendral, J. M. (2006). Nuclear transport of trimeric assembly intermediates exerts a morphogenetic control on the icosahedral parvovirus capsid. *J Mol Biol* **357**(3), 1026-38.

Riolobos, L., Valle, N., Hernando, E., Maroto, B., Kann, M., and Almendral, J. M. (2010). Viral oncolysis that targets Raf-1 signaling control of nuclear transport. *J Virol* **84**(4), 2090-9.

Rodeffer, H. E., Leman, A. D., Dunne, H. W., Cropper, M., and Sprecher, D. J. (1975). Reproductive failure in swine associated with maternal seroconversion for porcine parvovirus. *J Am Vet Med Assoc* **166**(10), 991-2.

Roic, B., Cajavec, S., Tonicic, J., Madic, J., Lipej, Z., Jemersic, L., Lojkic, M., Mihaljevic, Z., Cac, Z., and Sostaric, B. (2005). Prevalence of antibodies to porcine parvovirus in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia. *J Wildl Dis* **41**(4), 796-9.

Rommelaere, J., Geletneky, K., Angelova, A. L., Daeffler, L., Dinsart, C., Kiprianova, I., Schlehofer, J. R., and Raykov, Z. (2010). Oncolytic parvoviruses as cancer therapeutics. *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(2-3), 185-95.

Ros, C., Baltzer, C., Mani, B., and Kempf, C. (2006). Parvovirus uncoating in vitro reveals a mechanism of DNA release without capsid disassembly and striking differences in encapsidated DNA stability. *Virology* **345**(1), 137-47.

Ros, C., Burckhardt, C. J., and Kempf, C. (2002). Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol* **76**(24), 12634-45.

Ros, C., and Kempf, C. (2004). The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* **324**(2), 350-60.

Rubio, M. P., Guerra, S., and Almendral, J. M. (2001). Genome replication and postencapsidation functions mapping to the nonstructural gene restrict the host range of a murine parvovirus in human cells. *J Virol* **75**(23), 11573-82.

Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Vidal, D., Hofle, U., Villanua, D., Gauss, C., Segales, J., Almeria, S., Montoro, V., and Gortazar, C. (2006). Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology* **65**(4), 731-43.

Ruiz, Z., D'Abramo, A., Jr., and Tattersall, P. (2006). Differential roles for the C-terminal hexapeptide domains of NS2 splice variants during MVM infection of murine cells. *Virology* **349**(2), 382-95.

Russnak, R. H., Candido, E. P., and Astell, C. R. (1988). Interaction of the mouse chromosomal protein HMG-I with the 3' ends of genes in vitro. *J Biol Chem* **263**(13), 6392-9.

Sahli, R., McMaster, G. K., and Hirt, B. (1985). DNA sequence comparison between two tissue-specific variants of the autonomous parvovirus, minute virus of mice. *Nucleic Acids Res* **13**(10), 3617-33.

Saliki, J. T., Mizak, B., Flore, H. P., Gettig, R. R., Burand, J. P., Carmichael, L. E., Wood, H. A., and Parrish, C. R. (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.

Saliki, J. T., Rodgers, S. J., and Eskew, G. (1998). Serosurvey of selected viral and bacterial diseases in wild swine from Oklahoma. *J Wildl Dis* **34**(4), 834-8.



Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J., and Cornelis, J. J. (1990). Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMp is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* 5(1), 123-30.

Salome, N., van Hille, B., Geuskens, M., and Rommelaere, J. (1989). Partial reversion of conditional transformation correlates with a decrease in the sensitivity of rat cells to killing by the parvovirus minute virus of mice but not in their capacity for virus production: effect of a temperature-sensitive v-src oncogene. *J Virol* 63(11), 4797-807.

Salvino, R., Skiadopoulou, M., Faust, E. A., Tam, P., Shade, R. O., and Astell, C. R. (1991). Two spatially distinct genetic elements constitute a bipartite DNA replication origin in the minute virus of mice genome. *J Virol* 65(3), 1352-63.

Salzman, L. A., and Fabisch, P. (1979). Nucleotide sequence of the self-priming 3' terminus of the single-stranded DNA extracted from the parvovirus Kilham rat virus. *J Virol* 30(3), 946-50.

Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X., Brook, J. D., Housman, D. E., Epstein, N., and Hunter, L. A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J* 10(12), 3941-50.

Santaren, J. F., Ramirez, J. C., and Almendral, J. M. (1993). Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMp: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J Virol* 67(9), 5126-38.

Schlehofer, J. R., Ehrbar, M., and zur Hausen, H. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 152(1), 110-7.

Schneider, B., Fryer, J. F., Oldenburg, J., Brackmann, H. H., Baylis, S. A., and Eis-Hubinger, A. M. (2008). Frequency of contamination of coagulation factor concentrates with novel human parvovirus PARV4. *Haemophilia* 14(5), 978-86.

Schoborg, R. V., and Pintel, D. J. (1991). Accumulation of MVM gene products is differentially regulated by transcription initiation, RNA processing and protein stability. *Virology* **181**(1), 22-34.

Shackelton, L. A., Hoelzer, K., Parrish, C. R., and Holmes, E. C. (2007). Comparative analysis reveals frequent recombination in the parvoviruses. *J Gen Virol* **88**(Pt 12), 3294-301.

Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., and Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2), 379-84.

Shade, R. O., Blundell, M. C., Cotmore, S. F., Tattersall, P., and Astell, C. R. (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.

Shangjin, C., Cortey, M., and Segales, J. (2009). Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Res* **140**(1-2), 209-15.

Sharp, C. P., Lail, A., Donfield, S., Simmons, R., Leen, C., Klenerman, P., Delwart, E., Gomperts, E. D., and Simmonds, P. (2009). High frequencies of exposure to the novel human parvovirus PARV4 in hemophiliacs and injection drug users, as detected by a serological assay for PARV4 antibodies. *J Infect Dis* **200**(7), 1119-25.

Sharp, C. P., LeBreton, M., Kantola, K., Nana, A., Dikko, D., Djoko, C. F., Tamoufe, U., Kiyang, J. A., Babila, T. G., Ngole, E. M., Pybus, O. G., Delwart, E., Delaporte, E., Peeters, M., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K., Wolfe, N. D., and Simmonds, P. (2010). Widespread infection with homologues of human parvoviruses B19, PARV4, and human bocavirus of chimpanzees and gorillas in the wild. *J Virol* **84**(19), 10289-96.

Siegl, G., and Gautschi, M. (1976). Multiplication of parvovirus Lull in a synchronized culture system. III. Replication of viral DNA. *J Virol* **17**(3), 841-53.

Simmonds, P., Douglas, J., Bestetti, G., Longhi, E., Antinori, S., Parravicini, C., and Corbellino, M. (2008). A third genotype of the human parvovirus PARV4 in sub-Saharan Africa. *J Gen Virol* **89**(Pt 9), 2299-302.

Simpson, A. A., Chandrasekar, V., Hebert, B., Sullivan, G. M., Rossmann, M. G., and Parrish, C. R. (2000). Host range and variability of calcium binding by surface loops in the capsids of canine and feline parvoviruses. *J Mol Biol* **300**(3), 597-610.

Simpson, A. A., Chipman, P. R., Baker, T. S., Tijssen, P., and Rossmann, M. G. (1998). The structure of an insect parvovirus (*Galleria mellonella* densovirus) at 3.7 Å resolution. *Structure* **6**(11), 1355-67.

Simpson, A. A., Hebert, B., Sullivan, G. M., Parrish, C. R., Zadori, Z., Tijssen, P., and Rossmann, M. G. (2002). The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J Mol Biol* **315**(5), 1189-98.

Skiadopoulos, M. H., and Faust, E. A. (1993). Mutational analysis of conserved tyrosines in the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *Virology* **194**(2), 509-17.

Smith, G. J., Bahl, J., Vijaykrishna, D., Zhang, J., Poon, L. L., Chen, H., Webster, R. G., Peiris, J. S., and Guan, Y. (2009). Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(28), 11709-12.

Spalholz, B. A., and Tattersall, P. (1983). Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* **46**(3), 937-43.

Spegelaere, P., Cornelis, J. J., Tuynder, M., and Rommelaere, J. (1994). Lack of a detectable effect of capsid proteins on the cell-dependent activity of parvovirus MVMp promoters. *Res Virol* **145**(1), 5-12.

Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1991). Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J Virol* **65**(9), 4919-28.

Spitzer, A. L., Parrish, C. R., and Maxwell, I. H. (1997). Tropic determinant for canine parvovirus and feline panleukopenia virus functions through the capsid protein VP2. *J Gen Virol* **78** ( Pt 4), 925-8.

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

St Amand, J., Beard, C., Humphries, K., and Astell, C. R. (1991). Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. *Virology* **183**(1), 133-42.

Suikkanen, S., Aaltonen, T., Nevalainen, M., Valilehto, O., Lindholm, L., Vuento, M., and Vihinen-Ranta, M. (2003a). Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* **77**(19), 10270-9.

Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. (2003b). Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* **316**(2), 267-80.

Suikkanen, S., Saajarvi, K., Hirsimaki, J., Valilehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M., and Vuento, M. (2002). Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J Virol* **76**(9), 4401-11.

Summers, J., Jones, S. E., and Anderson, M. J. (1983). Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J Gen Virol* **64** (Pt 11), 2527-32.

Surosky, R. T., Urabe, M., Godwin, S. G., McQuiston, S. A., Kurtzman, G. J., Ozawa, K., and Natsoulis, G. (1997). Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* **71**(10), 7951-9.

Swiss Institute of Bioinformatics. (2010). Parvoviridae Virion. Access date 07/09/2010 [http://expasy.org/viralzone/all\\_by\\_species/199.html](http://expasy.org/viralzone/all_by_species/199.html)

Szelei, J., Liu, K., Li, Y., Fernandes, S., and Tijssen, P. (2010). Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerg Infect Dis* **16**(3), 561-4.

Tam, P., and Astell, C. R. (1993). Replication of minute virus of mice minigenomes: novel replication elements required for MVM DNA replication. *Virology* **193**(2), 812-24.

Tam, P., and Astell, C. R. (1994). Multiple cellular factors bind to cis-regulatory elements found inboard of the 5' palindrome of minute virus of mice. *J Virol* **68**(5), 2840-8.

Tattersall, P. (1972). Replication of the parvovirus MVM. I. Dependence of virus multiplication and plaque formation on cell growth. *J Virol* **10**(4), 586-90.

Tattersall, P. (2006). The evolution of parvovirus taxonomy. In "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 5-14. Hodder Arnold, London, UK.

Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M. E., Brown, K. E., Linden, M. R., Muzyczka, N., Parrish, C. R., and Tijssen, P. (2005). Parvoviridae. In "VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, Eds.), pp. 1162. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

Tattersall, P., and Bratton, J. (1983). Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J Virol* **46**(3), 944-55.

Tattersall, P., Crawford, L. V., and Shatkin, A. J. (1973). Replication of the parvovirus MVM. II. Isolation and characterization of intermediates in the replication of the viral deoxyribonucleic acid. *J Virol* **12**(6), 1446-56.

Tattersall, P., Shatkin, A. J., and Ward, D. C. (1977). Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J Mol Biol* **111**(4), 375-94.

Tattersall, P., and Ward, D. C. (1976). Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**(5573), 106-9.

Tauer, T. J., Schneiderman, M. H., Vishwanatha, J. K., and Rhode, S. L. (1996). DNA double-strand break repair functions defend against parvovirus infection. *J Virol* **70**(9), 6446-9.

Tijssen, P., Agbandje-McKenna, M., Almendral, J. M., Bergoin, M., Flegel, T. W., Hedman, K., Kleinschmidt, J., Li, Y., Pintel, D. J., and Tattersall, P. (2011). Family *Parvoviridae*. In "Virus Taxonomy: Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses"(A.King, E. Lefkowitz, M.J. Adams, E.B. Carstens, Eds.), In Press,. Elsevier Science Publishing Co Inc. USA.

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

Tijssen, P., Li, Y., El-Far, M., Szelei, J., Letarte, M., and Zadori, Z. (2003). Organization and expression strategy of the ambisense genome of densovirus of *Galleria mellonella*. *J Virol* **77**(19), 10357-65.

Tresnan, D. B., Southard, L., Weichert, W., Sgro, J. Y., and Parrish, C. R. (1995). Analysis of the cell and erythrocyte binding activities of the dimple and canyon regions of the canine parvovirus capsid. *Virology* **211**(1), 123-32.

Truyen, U., Agbandje, M., and Parrish, C. R. (1994). Characterization of the feline host range and a specific epitope of feline panleukopenia virus. *Virology* **200**(2), 494-503.

Truyen, U., Evermann, J. F., Vieler, E., and Parrish, C. R. (1996). Evolution of canine parvovirus involved loss and gain of feline host range. *Virology* **215**(2), 186-9.

Truyen, U., Gruenberg, A., Chang, S. F., Obermaier, B., Veijalainen, P., and Parrish, C. R. (1995). Evolution of the feline-subgroup parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol* **69**(8), 4702-10.

Truyen, U., and Parrish, C. R. (1992). Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo. *J Virol* **66**(9), 5399-408.

Tsao, J., Chapman, M. S., Agbandje, M., Keller, W., Smith, K., Wu, H., Luo, M., Smith, T. J., Rossmann, M. G., Compans, R. W., and et al. (1991). The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**(5000), 1456-64.

Tsao, J., Chapman, M. S., Wu, H., Agbandje, M., Keller, W., and Rossmann, M. G. (1992). Structure determination of monoclinic canine parvovirus. *Acta Crystallogr B* **48** ( Pt 1), 75-88.

Tullis, G. E., Burger, L. R., and Pintel, D. J. (1993). The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* **67**(1), 131-41.

Valle, N., Riolobos, L., and Almendral, J. M. (2006). Synthesis, post-translational modification and trafficking of the parvovirus structural polypeptides. *In* "Parvoviruses" (J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish, Eds.), pp. 291-304. Hodder Arnold, London, U.K.

Van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., Cornelis, J. J., and Rommelaere, J. (1989). Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology* **171**(1), 89-97.

Vanacker, J.-M., and Rommelaere, J. (1995). Non-structural proteins of autonomous parvoviruses: from cellular effects to molecular mechanisms. *Seminars in Virology* **6**(5), 291-297.

Vanacker, J. M., Corbau, R., Adelmant, G., Perros, M., Laudet, V., and Rommelaere, J. (1996). Transactivation of a cellular promoter by the NS1 protein of the parvovirus minute virus of mice through a putative hormone-responsive element. *J Virol* **70**(4), 2369-77.

Vanacker, J. M., Laudet, V., Adelmant, G., Stehelin, D., and Rommelaere, J. (1993). Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J Virol* **67**(12), 7668-72.

Vasudevacharya, J., and Compans, R. W. (1992). The NS and capsid genes determine the host range of porcine parvovirus. *Virology* **187**(2), 515-24.

Vengust, G., Valencak, Z., and Bidovec, A. (2006). A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **53**(1), 24-7.

Ventoso, I., Berlanga, J. J., and Almendral, J. M. (2010). Translation control by protein kinase R restricts minute virus of mice infection: role in parvovirus oncolysis. *J Virol* **84**(10), 5043-51.

Vicente, J., Leon-Vizcaino, L., Gortazar, C., Jose Cubero, M., Gonzalez, M., and Martin-Atance, P. (2002). Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain. *J Wildl Dis* **38**(3), 649-52.

Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P., and Vuento, M. (1997). Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem* **250**(2), 389-94.

Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V., and Vuento, M. (1998). Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* **72**(1), 802-6.



Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W. S., and Parrish, C. R. (2002). The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* **76**(4), 1884-91.

Vihinen-Ranta, M., Yuan, W., and Parrish, C. R. (2000). Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* **74**(10), 4853-9.

Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M., and Schlehofer, J. R. (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* **78** ( Pt 6), 1441-52.

Wang, D., and Parrish, C. R. (1999). A heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B-related protein binds to single-stranded DNA near the 5' end or within the genome of feline parvovirus and can modify virus replication. *J Virol* **73**(9), 7761-8.

Wang, D., Yuan, W., Davis, I., and Parrish, C. R. (1998). Nonstructural protein-2 and the replication of canine parvovirus. *Virology* **240**(2), 273-81.

Weichert, W. S., Parker, J. S., Wahid, A. T., Chang, S. F., Meier, E., and Parrish, C. R. (1998). Assaying for structural variation in the parvovirus capsid and its role in infection. *Virology* **250**(1), 106-17.

Wilhelm, S., Zimmermann, P., Selbitz, H. J., and Truyen, U. (2006). Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J Virol Methods* **134**(1-2), 257-60.

Willwand, K., Baldauf, A. Q., Deleu, L., Mumtsidu, E., Costello, E., Beard, P., and Rommelaere, J. (1997). The minute virus of mice (MVM) nonstructural protein NS1 induces nicking of MVM DNA at a unique site of the right-end telomere in both hairpin and duplex conformations in vitro. *J Gen Virol* **78** ( Pt 10), 2647-55.

Willwand, K., Moroianu, A., Horlein, R., Stremmel, W., and Rommelaere, J. (2002). Specific interaction of the nonstructural protein NS1 of minute virus of mice (MVM) with [ACCA]<sub>2</sub> motifs in the centre of the right-end MVM DNA palindrome induces hairpin-primed viral DNA replication. *J Gen Virol* **83**(Pt 7), 1659-64.

Willwand, K., Mumtsidu, E., Kuntz-Simon, G., and Rommelaere, J. (1998). Initiation of DNA replication at palindromic telomeres is mediated by a duplex-to-hairpin transition induced by the minute virus of mice nonstructural protein NS1. *J Biol Chem* **273**(2), 1165-74.

Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W., and Astell, C. R. (1991). Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* **185**(1), 90-8.

Wrathall, A. E. (1988). Field trials of an inactivated, oil-emulsion porcine parvovirus vaccine in British pig herds. *Vet Rec* **122**(17), 411-8.

Wu, H., Keller, W., and Rossmann, M. G. (1993). Determination and refinement of the canine parvovirus empty-capsid structure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49**(Pt 6), 572-9.

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

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

Yamagishi, J., Hu, Y., Zheng, J., and Bando, H. (1999). Genome organization and mRNA structure of *Periplaneta fuliginosa* densovirus imply alternative splicing involvement in viral gene expression. *Arch Virol* **144**(11), 2111-24.

Yan, Z., Zak, R., Luxton, G. W., Ritchie, T. C., Bantel-Schaal, U., and Engelhardt, J. F. (2002). Ubiquitination of both adeno-associated virus type 2 and 5 capsid proteins affects the transduction efficiency of recombinant vectors. *J Virol* **76**(5), 2043-53.

Young, P. J., Jensen, K. T., Burger, L. R., Pintel, D. J., and Lorson, C. L. (2002a). Minute virus of mice NS1 interacts with the SMN protein, and they colocalize in novel nuclear bodies induced by parvovirus infection. *J Virol* **76**(8), 3892-904.

Young, P. J., Jensen, K. T., Burger, L. R., Pintel, D. J., and Lorson, C. L. (2002b). Minute virus of mice small nonstructural protein NS2 interacts and colocalizes with the Smn protein. *J Virol* **76**(12), 6364-9.

Young, P. J., Newman, A., Jensen, K. T., Burger, L. R., Pintel, D. J., and Lorson, C. L. (2005). Minute virus of mice small non-structural protein NS2 localizes within, but is not required for the formation of, Smn-associated autonomous parvovirus-associated replication bodies. *J Gen Virol* **86**(Pt 4), 1009-14.

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

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

Zadori, Z., Szelei, J., and Tijssen, P. (2005). SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol* **79**(20), 13129-38.

Zeeuw, E. J., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H. J., and Truyen, U. (2007). Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J Gen Virol* **88**(Pt 2), 420-7.

Zentilin, L., Marcello, A., and Giacca, M. (2001). Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. *J Virol* **75**(24), 12279-87.

Zhai, S., Yue, C., Wei, Z., Long, J., Ran, D., Lin, T., Deng, Y., Huang, L., Sun, L., Zheng, H., Gao, F., Chen, S., and Yuan, S. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Arch Virol* **155**(8), 1313-7.

Zhang, R., Yang, S., Zhang, W., Zhang, T., Xie, Z., Feng, H., Wang, S., and Xia, X. (2010). Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China. *Virus Genes* **40**(3), 397-402.

Zhao, Q., Gersappe, A., and Pintel, D. J. (1995). Efficient excision of the upstream large intron from P4-generated pre-mRNA of the parvovirus minute virus of mice requires at least one donor and the 3' splice site of the small downstream intron. *J Virol* **69**(10), 6170-9.

Zhao, Q., Schoborg, R. V., and Pintel, D. J. (1994). Alternative splicing of pre-mRNAs encoding the nonstructural proteins of minute virus of mice is facilitated by sequences within the downstream intron. *J Virol* **68**(5), 2849-59.

Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H. J., Heinritzi, K., and Truyen, U. (2006). VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J Gen Virol* **87**(Pt 2), 295-301.

# **Annexe I**

Plusieurs voies sont impliquées dans l'entrée et le transport jusqu'au noyau du  
Parvovirus Porcin dans la cellule hôte

## Résumé de l'Annexe I

Boisvert M., Fernandes S. et Tijssen P. (2010). Multiple pathways involved in Porcine Parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *Journal of Virology*, 84 (15): 7782-92.

Le Parvovirus Porcin (PPV) est une cause importante de problèmes de reproduction chez le porc. Les mécanismes impliqués dans les premières étapes de l'infection, qui mènent à la livraison du génome au noyau, sont méconnus. Dans le présent travail, une série d'inhibiteurs chimiques ont été utilisés afin de disséquer les mécanismes cellulaires impliqués dans l'établissement de l'infection par le PPV. Les résultats ont démontré qu'à la suite de la liaison aux acides sialiques sur les glycoprotéines de la surface cellulaire, le virus utilise l'endocytose par les vésicules recouvertes de clathrine et la macropinocytose pour son internalisation. Les virions obtenus à partir des cellules infectées se retrouvent soit sous la forme de particules isolées ou bien en agrégats et ces deux formes pouvaient être séparées par centrifugation à basse vitesse. Les particules isolées et purifiées démontraient une forte préférence pour l'entrée via les vésicules de clathrine tandis que les agrégats favorisaient la macropinocytose. L'acidification des endosomes et le transport dans la voie endosomale étaient aussi essentiels pour le virus. Le réseau de microtubule était important au cours des 10 premières heures de l'infection, tandis que l'activité dynamique du réseau de l'actine était nécessaire pour la durée entière du cycle infectieux. Une interaction avec le protéasome était aussi essentielle et les capsides étaient ubiquitinées au cours des étapes précoces de l'infection. Somme toute, ces résultats ont clarifié le parcours du PPV lors des premières étapes de l'infection et ont identifié une nouvelle voie d'entrée alternative pour ce virus, qui est unique au sein des membres de cette famille virale.

## Multiple Pathways Involved in Porcine Parvovirus Cellular Entry and Trafficking toward the Nucleus<sup>∇</sup>

Maude Boisvert, Sandra Fernandes, and Peter Tijssen\*

INRS—Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531, boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Received 3 March 2010/Accepted 12 May 2010

Porcine parvovirus (PPV) is a major cause of reproductive failure in swine. The mechanisms implicated in the first steps of infection that lead to the delivery of the PPV genome to the nucleus are poorly understood. In the present work, a panel of chemical inhibitors was used to dissect the cellular mechanisms involved in establishing a PPV infection. The results demonstrated that following binding to sialic acids on cell surface glycoproteins, the virus used both clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis pathways to gain access into cells. Virus obtained from infected cells was present either as isolated particles or as aggregates, and these two forms could be separated by low-speed centrifugation. Isolated and purified particles strongly preferred entry by clathrin-mediated endocytosis, whereas aggregates clearly favored macropinocytosis. Subsequent endosomal acidification and traffic to the late endosomes were also shown to be essential for infection. The microtubule network was found to be important during the first 10 h of infection, whereas an intact actin network was required for almost the whole viral cycle. Proteasome processing was found to be essential, and capsid proteins were ubiquitinated relatively early during infection. Taken together, these results provided new insights into the first steps of PPV infection, including the use of alternative entry pathways, unique among members of this viral family.

Porcine parvovirus (PPV) is a major causative agent of reproductive failure in swine, a syndrome that includes infertility, early embryonic death, mummified fetuses, and stillbirth (54). PPV belongs to the *Parvovirus* genus in the *Parvovirinae* subfamily of the *Parvoviridae* family (55). This family is characterized by small nonenveloped, icosahedral viruses with a diameter of about 26 nm. The genome of these viruses is a linear, negative single-stranded DNA of about 5 kb featuring distinct hairpin termini (3, 4). Transcript mapping revealed promoters for both the nonstructural and structural protein gene cassettes, and intricate splicing mechanisms generate several proteins from each promoter (4). The 3-dimensional (3D) structure of this virus has been determined by X-ray crystallography (49). The compact structure of the capsid confers great stability under different conditions, including wide ranges of pH and high temperatures (11). Infectious particles contain a total of 60 VP1/VP2 proteins arranged in a T=1 capsid (49). The VP1 protein consists of the VP2 sequence with an N-terminal extension that is normally folded within the particle (49). During entry, about 22 to 25 amino acids of the N termini of the majority of the VP2 proteins are cleaved off, forming VP3 (11) and allowing the N terminus of VP1 to be externalized during passage in the endosomes (8). The unique N-terminal part of the VP1 protein contains a viral phospholipase A2 (PLA2) motif. This protein is not crucial for the assembly of progeny virions but is essential for the infectivity of the virions (57). The enzyme's activity provides the virus with the means to breach the endosomal barrier (16, 68).

Parvoviruses deploy a plethora of strategies to deliver the

genome to their site of replication, the nucleus (10, 11, 61). The sturdy, extracellular viral particles undergo multistep conformational changes that are locally and temporally regulated by specific intracellular signals after interaction of the capsid with cell surface receptor (11, 64). Particle-to-infectivity ratios are at least 250:1 (68). Therefore, productive and nonproductive pathways are difficult to distinguish, making it challenging to understand the specific trafficking of parvoviruses. Nevertheless, several discrete steps have been recognized (27, 64): (i) initial interaction with cell surface receptors (17, 19–23, 36), (ii) trafficking through the endosomal pathway (32, 41, 52, 60, 68), (iii) escape from the endosomes through the newly exposed viral PLA2 (16, 39, 41, 52), and (iv) cytoskeleton-driven transport to the nucleus (38, 50, 60). Although most parvoviruses use equivalent routes for gaining access to the cell, there are considerable differences among species. The mechanisms involved in these early steps are poorly understood for PPV.

Some viruses use complicated multistep attachment and binding to specific receptors, while others bind more common structures, such as sialic acids (9, 58). These structures are located at the ends of glycans; they are fairly accessible for protein binding and for virus docking; and their density may increase avidity (2). Several parvoviruses bind specifically to the transferrin receptor, including feline parvovirus (FPV) (40) and canine parvovirus (CPV) (41). Minute virus of mice (MVM) and bovine parvovirus (BPV) bind the cells via sialic acids (24, 31), whereas the human parvovirus B19 binds to the blood group P antigen and integrin  $\alpha 5 \beta 1$  on erythroid progenitor cells (7, 63). In the case of PPV, the specific receptor remains unknown, but the transferrin receptor is not essential, since the virus is able to enter quail cells lacking this receptor (unpublished data).

Binding to specific receptors can trigger entry of the virus via the ubiquitous and constitutive clathrin-coated pit endocytosis

\* Corresponding author. Mailing address: INRS—Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531, boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010, ext. 4425. Fax: (450) 686-5627. E-mail: peter.tijssen@iaf.inrs.ca.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 19 May 2010.

mechanism (45). This well-studied pathway requires specific receptor attachment to promote cell membrane invagination and assembly of the clathrin cage (42). At the early-endosome stage, a sorting step determines if the vesicle is recycled back to the cell membrane or proceeds further in the endosomal pathway toward the late endosomes and lysosomes (5). Another well-known endocytosis mechanism takes place in cholesterol-rich lipid rafts (29). Caveolar endocytosis is not constitutive and needs to be triggered. This entry mode has been shown to be responsible for simian virus 40 (SV40) infection (37), and among the parvoviruses, only adeno-associated virus 5 (AAV5) is known to use it (1). A third mechanism for virus entry into a cell is macropinocytosis (53). Although this actin-driven endocytosis displays a low rate in several cell types, it can be upregulated after the interaction of a virus with the cell (15). In contrast to the two endocytosis pathways described above, actin-driven endocytosis does not require specific receptor binding (25). After their formation, the macropinosome vesicles are acidified as in the endosomal pathway. Other, less common "nonclathrin-noncaveolar" endocytosis mechanisms are now emerging (33, 35, 48).

Most of the entry pathways described above lead to endosomal or endosome-like pathways, characterized by acidification and exposure to several proteases meant to destroy the vesicle contents. However, several viruses take advantage of these changes in the environment to trigger conformational changes in their capsids or fusion with the endosome's membrane (50, 51). For parvoviruses, externalization of the unique part of the VP1 capsid protein is essential to infection (16, 39, 41, 52), since it exposes the catalytically active viral PLA2 domain, which is essential for establishing a productive infection (68). The transport of endosomal vesicles is mediated by microtubules (MTs) and proceeds toward the microtubule organization center (MTOC), located in the perinuclear region (18, 62). Accordingly, trafficking to the late endosomes/lysosomes is beneficial not only for conformational changes but also for transport to the nucleus. Once it has escaped to the cytoplasm, the capsid itself could interact with the MT motors or with the actin network components (44, 46, 59).

Important cellular processes involved in different virus infections may include the proteasome (12, 47, 56, 67). This component degrades targeted proteins into small peptides, which are then processed by cellular proteases, yielding amino acids (28). In the case of parvoviruses, the role of the proteasome can be beneficial or detrimental to the infection cycle, depending on the virus. AAV virions are degraded by the proteasome, aborting the infection (13). On the other hand, proteasome processing is required for productive MVM infection, although the mechanism remains unclear (46, 47).

In this study, a panel of chemical inhibitors was used to investigate the cellular entry and transport of PPV. To minimize the side effects of these pharmacological inhibitors, two drugs, known to be the most selective, were used to target cellular components at concentrations that least compromised their specificity while remaining effective. The infection could be inhibited by removal of sialic acid moieties from cell surface glycoproteins. Virus entry could also be partially inhibited by both clathrin and macropinocytosis inhibitors, while isolated/purified or aggregated PPV particles were shown to preferentially use alternative entry modes. After the virus gained entry

into the cells, inhibition of endosomal acidification, traffic to the late endosomes, or destruction of either microtubules or actin networks greatly reduced the infection. Finally, capsid proteins were ubiquitinated early during infection, as shown by coimmunoprecipitation, and inhibition of the proteolytic activities of the proteasome almost completely abolished the infection.

#### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals and antibodies.** Neuraminidase (Neura), amiloride (Ami), chlorpromazine (Chl), nystatin (Ny), methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MBC), and MG-132 were purchased from Sigma. Cytochalasin D (CyD), nocodazole (Noc), paclitaxel (Pac), latrunculin A (LatA), and lactacystin (Lac) were purchased from Calbiochem. Bafilomycin A1 (Baf) was purchased from LC Labs and brefeldin A (BFA) from BioLegend. Protease inhibitors (Complete; EDTA-free tablets) and the colorimetric substrate nitroblue tetrazolium (NBT)-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) were purchased from Roche Applied Science. The 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) viability assay kit was purchased from Sigma. Anti-PPV antibodies included mouse monoclonal antibody 3C9 (ATCC CRL-1745), specific to the PPV capsid, and a polyclonal rabbit anti-VP2 ( $\alpha$ -VP2) antibody obtained via rabbit immunization (8). The mouse monoclonal anti-ubiquitin ( $\alpha$ -Ub) antibody (P4D1) was purchased from Santa Cruz. Secondary antibodies included alkaline phosphatase (AP)-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Bio-Rad) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse and anti-rabbit antibodies (Invitrogen).

**Cells and viruses.** Porcine testis (PT) fibroblasts, derived from ST cells (ATCC CRL-1746) (4), were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO-Invitrogen) containing D-glucose and L-glutamine and supplemented with 7% heat-inactivated fetal bovine serum (Wisent) and antibiotics (penicillin/streptomycin; Invitrogen). The NADL-2 vaccine strain of PPV was used for infection (ATCC VR-742), and viral stocks were obtained by propagation in cell culture. PPV was collected in the supernatant after cell lysis and was used directly in the experiments unless otherwise indicated. Viral stocks were titrated by immunofluorescence (IF) in 96-well plates at 20 h postinfection (p.i.) with the capsid-specific mouse monoclonal antibody 3C9, together with an Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse antibody as a secondary antibody. Fluorescent nuclei were scored, and virus titers were expressed as fluorescent focus-forming units (FFU) per milliliter.

From the crude preparation, aggregates and isolated particles of PPV were separated by centrifugation at  $15,000 \times g$  for 10 min. Isolated particles were obtained directly in the supernatant, and aggregates were found in the pellet, reconstituted with the same volume of cell culture medium. Electron micrographs showed that there were no or very few isolated particles in the aggregate preparations and very few aggregates in the isolated stock (data not shown).

**PPV purification.** Purified virus was obtained from PPV-infected PT cell supernatants. Crude supernatants were first cleared by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 45 min at 4°C. PPV was precipitated from the supernatant by using 7.5% polyethylene glycol 8000 (PEG 8000)–1.5 M NaCl (final concentrations) for 16 h at 4°C and was collected by centrifugation at  $15,000 \times g$  for 45 min at 4°C. The pellet was dissolved in 5 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and was dialyzed overnight against the same buffer. Virus was also extracted from the cell debris fraction from the first centrifugation. The pellet was resuspended in 10 ml of 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) and was treated with 2 ml of  $1 \times$  trypsin and 50 U of DNase I for 4 h at 37°C. Then PPV was extracted using 1 volume of chloroform and centrifugation at  $3,500 \times g$  for 10 min. These two PPV preparations were then purified using ultracentrifugation over sucrose cushions (2 ml of 50% sucrose plus 2 ml of 20% sucrose) at  $200,000 \times g$  for 2 h. Fractions were collected and subjected to 10% sodium dodecyl sulfide-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Coomassie staining to detect PPV proteins. Positive fractions were pooled and dialyzed against 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0). A second round of purification by ultracentrifugation was performed as described above. The final purified PPV was titrated by IF as described in the previous section.

**Drug treatments and PPV infection.** For IF experiments, cells were plated onto glass coverslips at  $5 \times 10^4$  per well in 24-well plates. For quantitative PCR (qPCR) experiments, cells were plated directly onto the plates, as described for IF experiments. For inhibitors, dose-response curves were obtained by treating cells with increasing concentrations of each inhibitor, and toxic doses were determined by the MTT assay according to the manufacturer's instructions



(Sigma). The optimal dose of each inhibitor was determined to be the concentration displaying the best inhibition of infection without detectable toxic effects on the cells. One day after plating, cells were treated with the optimal dose of inhibitor for the times indicated below and were infected with NADL-2 at a multiplicity of infection (MOI) of 2 for IF and 0.1 for qPCR. Cells were either fixed (IF) or harvested (qPCR) 20 h p.i. As a control, the impact of the inhibitors on cell growth was also evaluated by qPCR with specific c-myc primers as described below, after treatment of the cells with optimal doses of inhibitors for 20 h.

For neuraminidase treatments, cells were treated for 1 h with increasing concentrations of neuraminidase and were washed three times with 1× phosphate-buffered saline (PBS, comprising 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 144.3 mM NaCl, and 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) to remove cleaved sialic acids. Cells were then infected, in the presence of neuraminidase, for 2 h and were washed again. Infection was allowed to proceed for a total of 20 h in the presence of a low dose of neuraminidase (2 mU/ml).

For entry experiments, cells were treated for 1 h with either inhibitor, infected with NADL-2 in the presence of the inhibitors, and washed 2 h p.i. to remove all viruses in the supernatant. Cells were then treated with neuraminidase (2 mU/ml) to remove all bound virus that failed to enter the cells. Binding experiments were also performed with entry inhibitors. Cells were treated for 1 h at 37°C and were subsequently chilled to 4°C in order to completely inhibit PPV entry in the cells. PPV was then added, and cells were incubated at 4°C for 2 h. Cells were gently washed with cold 1× PBS to remove unbound virus and were transferred to 37°C for 2 h to allow entry. Cells were washed again and were incubated for a total of 20 h at 37°C.

For cytoplasmic trafficking experiments and proteasome processing, cells were treated 1 h prior to infection, and the inhibitors remained present for the duration of the infection. However, since the inhibitor for the actin network (latrunculin A) can block cytoplasmic trafficking and macropinocytosis, it was added 2 h p.i. and was kept for the rest of the infection. Pulse experiments were also performed by adding the inhibitors (Noc, LatA, Baf, BFA, and MG-132) at different times throughout the infection.

**Immunofluorescence.** At designated times, or at 20 h p.i., cells were fixed with 3% formaldehyde in IF buffer (1× PBS, 0.02% sodium azide, and 0.1% bovine serum albumin [BSA]) for 30 min and were washed three times with 1× PBS. Cells were permeabilized with 3% Triton X-100 in IF buffer for 30 min and were washed three times with 1× PBS. PPV was detected with the mouse monoclonal anti-capsid antibody 3C9 as a primary antibody for 1 h (diluted 1:50 in IF buffer). Cells were washed with 1× PBS and were incubated with a goat anti-mouse secondary antibody, conjugated with Alexa Fluor 488, for 1 h (1:2,000 in IF buffer). Finally, DNA was stained with Hoechst 33258 (2 µg/ml) for 30 min, and coverslips were fixed on slides that were kept at 4°C in the dark until they were read. Percentages of infected cells were obtained by scoring the virus-positive nuclei as a proportion of total nuclei. For each experiment, the infection level of untreated cells was arbitrarily set at 100%. For each inhibitor, at least 300 cells were scored for each coverslip (samples in triplicate) in at least three independent experiments.

**qPCR.** At 20 h p.i., cells were washed with 1× PBS. Cells were scraped from the plate in 150 µl of STE buffer (1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.5]) and were harvested in tubes. Then 500 µl of heated lysis buffer was added (0.75% SDS, 1.25 M NaCl, 20 mM Tris [pH 7.5], 10 mM EDTA, 100 µg/ml proteinase K, 100 µg/ml RNase). Tubes were incubated at 37°C for 4 h and were chilled at -20°C for at least 30 min. The supernatants were collected after a 20-min centrifugation at 20,000 × g and 4°C. DNA was then extracted with 500 µl Miniprep Express matrix (MP Biomedicals) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted with 100 µl of PCR water. Each sample was diluted 1:10 for PCR purposes, and qPCR was performed as described previously (66) to determine the number of PPV genome copies. Primers specific to the VP2 region (forward primer, 5'-GGG GGA GGG CTT GGT TAG AAT CAC-3'; reverse primer, 5'-ACC ACA CTC CCC ATG CGT TAG C-3'; based on GenBank accession no. NC\_001718.1) were used. The cellular DNA content was used to normalize the results with qPCR targeting the c-myc gene (forward primer, 5'-CTC CCT GAG ACT CTG CCA TC-3'; reverse primer, 5'-GCT GCC TCT TTT CCA CAG AA-3'; based on GenBank accession no. X97040.1). Cycling conditions were as follows: 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. Fluorescence was acquired after each cycle. Amplifications were carried out in a RotorGene 3000 system (Corbett) with 2× Sybr green master mix (ABSciences). Standard curves were performed using a plasmid containing PPV or c-myc DNA. A myc DNA fragment was cloned into the pSmartHC AmpR vector (GenBank accession no. AF399742; Lucigen) by the addition of HindIII and BamHI restriction sites (forward primer, 5'-CGTAAG CTTTCGGACTCTCTGCTCTCTC-3'; reverse primer, 5'-CTGTCTAGAGC

TGCCTCTTTCCACAGAA-3'). PPV curves were made using the infectious clone in the pSmartHC AmpR vector. Melting curve analysis was performed from 60°C to 95°C, with a temperature increase of 1°C at each step of 30 s, for a specific product amplification control.

**Colmunoprecipitation and Western blotting.** Cells were plated in 6-well plates (3 × 10<sup>5</sup> cells/well) 1 day before the experiment. Cells either were mock treated or were treated with MG-132 at 5 µM. Cells were lysed at different times postinfection using lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1× Complete protease inhibitor cocktail [Roche Applied Science]) and were incubated for 2 h on ice. Lysates were precleared with 20 µl of protein G-agarose beads for 30 min on ice with gentle shaking and were centrifuged for 30 s at 10,000 × g (quick spin). Supernatants were incubated with a specific antibody, either an anti-capsid (3C9) or an α-Ub (P4D1; Santa Cruz) antibody, for 1 h on ice, with gentle shaking. A 50-µl volume of protein G-agarose beads was then added, and the mixture was further incubated for at least 2 h. Beads were pelleted by quick-spin centrifugation and were then washed three times with lysis buffer, twice with washing buffer 1 (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 500 mM NaCl, 0.1% NP-40), and once with washing buffer 2 (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.1% NP-40). For each wash, 500 µl of buffer was added and incubated 5 min on ice with agitation before a quick spin. Proteins were eluted with 2× SDS-PAGE sample buffer (125 mM Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol) in boiling water for 5 min. Samples were separated by 10% SDS-PAGE and were transferred to nitrocellulose membranes. Primary antibodies (rabbit α-VP2 at 1:1,000 or mouse α-Ub at 1:200) were diluted in 5% milk in 1× TBS buffer (10 mM Tris-Cl [pH 8.0], 150 mM NaCl) and were incubated with the membrane for 1 h with agitation. Anti-mouse or anti-rabbit antibodies conjugated with AP were used as secondary antibodies (diluted 1:1,000 in 5% milk in 1× TBS buffer). Detection was performed directly on the membrane by using the colorimetric AP substrate NBT-BCIP, according to the manufacturer's recommendations (Roche).

**Confocal microscopy.** Cells were plated on glass coverslips (5 × 10<sup>4</sup> cells/well in a 24-well plate) 1 day prior to the experiment. Cells were then treated or mock treated with 5 µM MG132. Cells were infected with NADL-2 and fixed at the indicated times. Indirect IF was performed as described above. Coverslips were incubated with the mouse anti-capsid antibody 3C9. Goat anti-mouse antibodies coupled with Alexa Fluor 488 were used as secondary antibodies. Images were collected on a Bio-Rad Radiance 2000 confocal system, with an Ar-Kr laser and a 60× oil objective (numerical aperture [N.A.], 1.4). Fluorescence was detected at 515 nm.

**Statistical analysis.** Data were analyzed by the unpaired two-tailed *t* test using 99% confidence intervals. Analyses were performed with GraphPad Prism software, version 5.

## RESULTS

**Overall PPV replication kinetics.** The general replication kinetics of the NADL-2 strain of PPV on PT cells is shown in Fig. 1. The first steps of the high-MOI (50 FFU/cell) infection were followed by the detection of viral capsids by indirect immunofluorescence (with monoclonal antibody 3C9). After cell entry, capsids accumulated on one side of the nucleus by 4 to 8 h postinfection (p.i.). Newly synthesized virions were found in the nucleus by 16 to 20 h p.i., before cell lysis (Fig. 1A). DNA replication, monitored by quantitative PCR (qPCR) on cell lysates after infection at a low MOI (0.1 FFU/cell), started at 8 to 12 h p.i. (Fig. 1B).

**Inhibitor optimization.** All inhibitors were tested for toxic effects on the cells used in this study (PT cells) by the MTT assay (Sigma). The toxic doses, which are the first concentrations that have an effect on cell viability, are shown in Table 1. Then a dose-response curve was obtained in order to determine the concentration that had the most effect on viral infection (data not shown). The optimal dose of each inhibitor could be defined as the concentration displaying the greatest inhibition of viral infection without being toxic to the cells (Table 1). The effects of the inhibitors on cell growth were also evaluated by incubating cells with the optimal dose of each inhibitor for 20 h.

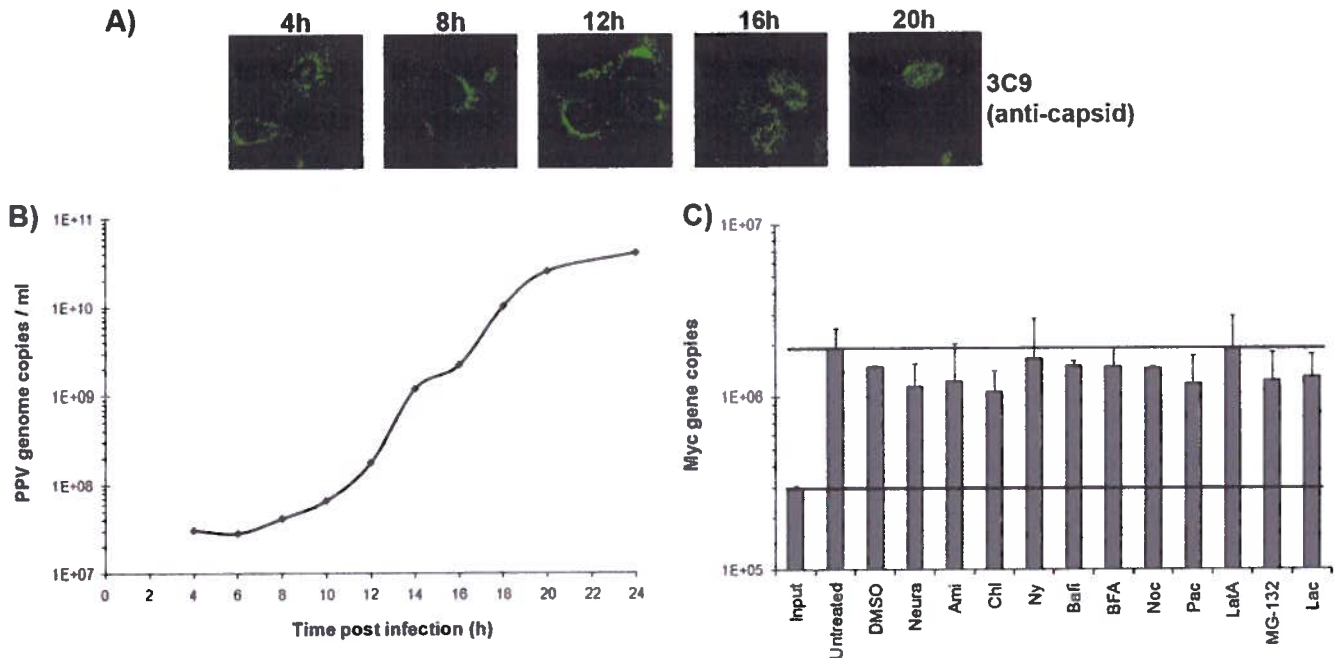


FIG. 1. Kinetics of PPV infection. (A) Detection of viral capsids at different times p.i. in PT cells by immunofluorescence using the capsid-specific antibody 3C9 and an Alexa Fluor 488-coupled secondary antibody. (B) Amplification of the viral genome. qPCR specific to PPV was performed on cell lysates collected at different times p.i. (C) Cell DNA content in the presence of inhibitors, as an indication of side effects of the inhibitors on cell growth, determined by qPCR with c-myc gene-specific primers after 20 h of incubation with the optimal dose of each inhibitor.

qPCR using specific c-myc gene primers was performed to evaluate cell density. As demonstrated in Fig. 1C, the inhibitors used in this study failed to have any significant short-term effect on cell growth. This result correlated with that of the MTT assay.

**Binding of PPV on cells.** The efficiency of the infection was evaluated at 20 h p.i. by immunofluorescence. The number of capsid-positive cells was compared to the total number of cells on each slide. The effect of each inhibitor was expressed as the

TABLE 1. Chemical inhibitors

Cellular component	Inhibitor	Effect on cells	Optimal concn <sup>a</sup>	Toxicity <sup>b</sup>
Sialic acids	Neuraminidase	Catalyzes the hydrolysis of <i>N</i> -acetylneuraminic acids on cell surface glycoproteins	5 mU/ml	20 mU/ml
Clathrin	Chlorpromazine K <sup>+</sup> depletion	Inhibits pit formation by clathrin relocation at the endosomes Aggregates clathrin in empty small cages	10 μM Buffer	100 μM
Caveolae	Nystatin Methyl-β-cyclodextrin	Inhibits caveolin pit formation; sequesters cholesterol Inhibits cholesterol translocation toward lipid rafts	100 μM 1 mM	1 mM 10 mM
Macropinocytosis	Amiloride Cytochalasin D	Inhibits Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -ATPase exchangers, preventing membrane extension formation Inhibits actin polymerization for membrane extension	100 μM 50 μM	>250 μM 75 μM
Microtubules	Nocodazole Paclitaxel	Inhibits tubulin subunit polymerization; inhibits endosome trafficking Inhibits microtubule dynamics, preventing depolymerization	10 μM 0.5 μM	100 μM 1 μM
Actin	Cytochalasin D Latrunculin A	Inhibits actin polymerization (binds to filaments) Inhibits actin polymerization (binds to monomers)	50 μM 0.1 μM	75 μM 0.5 μM
Endosomal pathway	Bafilomycin Brefeldin A	Inhibits endosomal acidification through vacuolar H <sup>+</sup> /ATPase pump block Inhibits translocation to late endosomes	100 nM 500 nM	500 nM 1 μM
Proteasome	MG-132 Lactacystin	Inhibits the 26S subunits of the proteasome, preventing proteolytic activity Inhibits the β subunits of the proteasome, preventing proteolytic activity	1 μM 5 μM	10 μM 10 μM

<sup>a</sup> Concentrations shown in Results displaying optimal inhibition of PPV replication without significant side effects (by the MTT assay).

<sup>b</sup> Determined by the MTT assay.

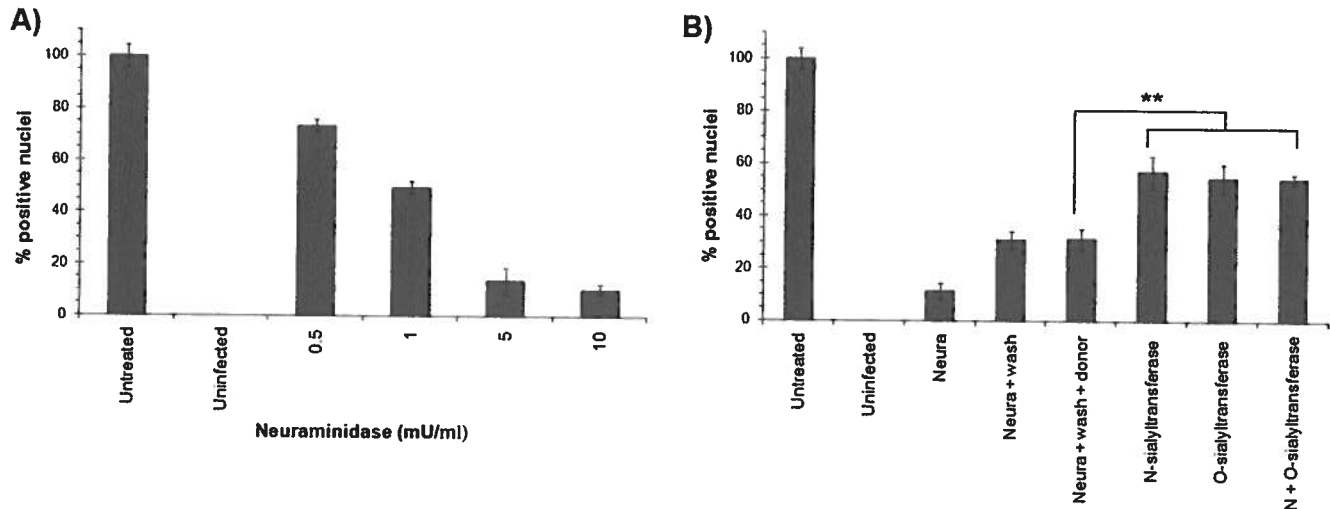


FIG. 2. PPV binding on the cell surface. (A) PT cells were treated with increasing amounts of neuraminidase in order to remove sialic acid moieties on cell surface glycoproteins. After a wash, PPV was added to the cells for 2 h. Unbound virus was removed by a wash at 2 h p.i., and infection was continued for an additional 18 h. The percentage of infected cells was compared to that of untreated cells (arbitrarily set at 100%) by IF with the capsid-specific antibody 3C9 and DNA staining (Hoechst). (B) Efficiency of infection recovery after neuraminidase treatment followed by specific reconstruction of sialic acids, using O- or N-sialyltransferases, on the cell surface proteins prior to infection. Percentages of infected cells were determined by IF (\*\*,  $P < 0.004$  by the  $t$  test).

efficiency of infection relative to that for untreated cells. The first step of PPV infection was determined to be the binding of the capsid to sialic acid on cell surface glycoproteins. As shown in Fig. 2A, neuraminidase treatment of the cells, which cleaves sialic acids at the cell surface, greatly impeded viral infection in a dose-dependent manner. Moreover, the infection could be partially reconstituted after the rebuilding of sialic acid moieties using either  $\alpha$ -(2,3)-O-sialyltransferase or  $\alpha$ -(2,3)-N-sialyltransferase (10 mU). Therefore, both O- and N-linked sialic acids seem to be used by the virus to enter the cells (Fig. 2B). Cells were capable of rebuilding some receptors by themselves, since removal of the neuraminidase, without the addition of any enzyme, doubled the number of infected cells. The presence of the donor only (cytidine 5'-monophospho-N-acetylneuraminic acid) did not help receptor reconstruction or increase the level of infection. Finally, the addition of each sialyltransferase alone or in combination did not reconstitute the infection to the 100% level, even when more enzyme was added (up to 25 mU) (data not shown).

**Viral entry into cells.** To investigate the pathways implicated in PPV entry, multiple inhibitors were used to target each pathway. A description of these inhibitors, and the concentrations used in this study, is shown in Table 1. After one infection cycle (20 h), the percentages of infected cells in the presence of the inhibitors were compared to those for untreated cells. The results shown in Fig. 3A (for optimal doses only) demonstrated that both clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis were important for PPV entry. Inhibition of caveolae had no effect on viral entry. These results were confirmed by qPCR of cell lysates at 20 h p.i. using PPV-specific primers (Fig. 3B). However, complete inhibition could not be achieved, even when clathrin and macropinocytosis inhibitors were combined, suggesting that one or more other entry pathways may be important for PPV. In both cases (percentage of infection and genome replication), the inhibition level was about 50%. As a

control, the effects of the inhibitors on viral binding to the cell surface were also evaluated. The virus was incubated with inhibitor-treated cells at 4°C. The cells were then washed or not before incubation for 20 h at 37°C. The results in Fig. 3C show that inhibitors of clathrin, caveolae, or macropinocytosis had no effect on the binding of PPV to the cell surface. Furthermore, the inhibitors acted only during entry steps, as demonstrated in pulse experiments (Fig. 3D), and the addition of each inhibitor at 2 h p.i. or later had no detectable effect on PPV infection. Finally, the same results were observed whether the inhibitors were present throughout the infection or only during entry, suggesting that there were no significant secondary effects on the cells.

The importance of both specific and nonspecific pathways prompted us to further examine different arrangements of viral particles. When PPV was amplified in cell culture, a suspension containing the virus and cell fragments was obtained after virus-induced cell lysis. These preparations contained isolated viruses and clumps of PPV particles (aggregates), as observed by electron microscopy (data not shown), which could be separated through low-speed centrifugation. Four different viral stocks were used in order to compare the different inhibitors. The first was the crude preparation containing both types of particles. The aggregates were found in the centrifugation pellet, reconstituted with the same volume of cell culture medium, while single particles remained in the centrifugation supernatant. Finally, purified particles were isolated by ultracentrifugation on sucrose cushions. Approximately the same amounts of infectious particles and genome copies were obtained as isolated particles and as aggregate preparations (demonstrated by viral titration and quantitative PCR [data not shown]). The abilities of these different particle types to initiate infection in the presence of entry inhibitors were compared. The results shown in Fig. 3E indicated that single particles were more sensitive to inhibition by chlorproma-

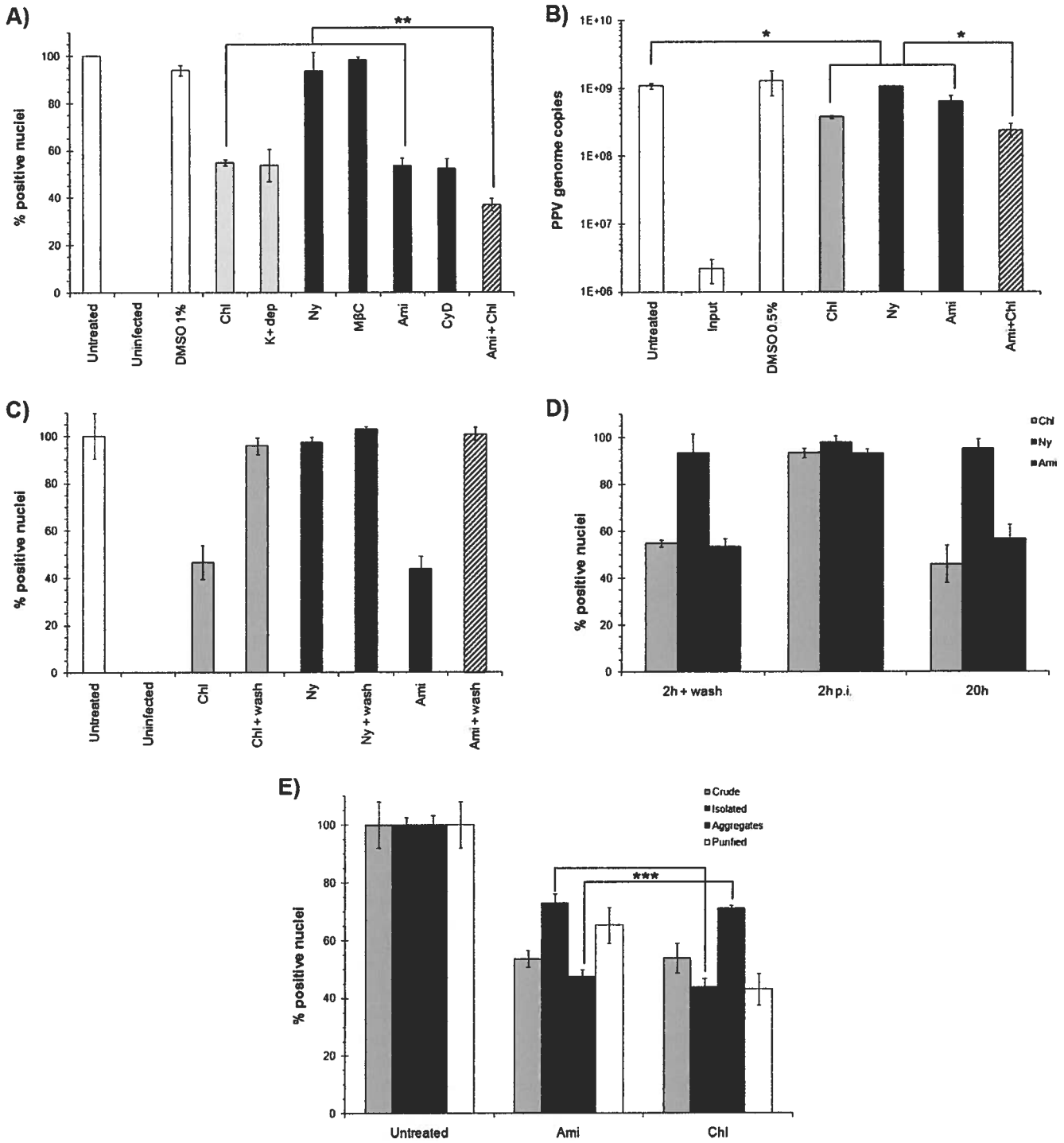


FIG. 3. Entry pathways. (A) Inhibition of the major cellular entry pathways during PPV infection. Optimal concentrations of inhibitors of clathrin endocytosis (chlorpromazine and K<sup>+</sup> depletion) (light shaded bars), caveolae (nystatin and methyl-β-cyclodextrin) (filled bars), and macropinocytosis (amiloride and cytochalasin D) (dark shaded bars) were used. The percentage of cells infected was determined at 20 h by indirect IF experiments as described for Fig. 2. The combination of clathrin and macropinocytosis inhibitors (striped bars) failed to completely abolish infection (\*\*, *P* < 0.003 by the *t* test). (B) Inhibition of genome replication measured by qPCR with specific PPV primers after treatment with inhibitors as for panel A (\*, *P* < 0.03 by the *t* test). (C) Binding assay. Inhibitors were present only for the first 2 h with PPV at 4°C and were removed at the time of washing to eliminate unbound virus. The infection was continued in normal cell culture medium for 20 h. (D) Pulse inhibition. Clathrin endocytosis and macropinocytosis inhibitors either were added prior to infection and were present only for the first 2 h of infection, after which cells were washed; were added 2 h p.i.; or were added prior to infection and left during the whole infection (20 h). (E) Inhibition of distinct particle types. Shown are results for crude preparations (infected cell culture supernatants), isolated particles and aggregates (both separated by low-speed centrifugation of the crude preparation), and purified particles. To determine the inhibition of the clathrin and macropinocytosis pathways for each particle type, infections were carried out with the same amount of PPV, as determined by qPCR (\*\*\*, *P* < 0.0003 by the *t* test).

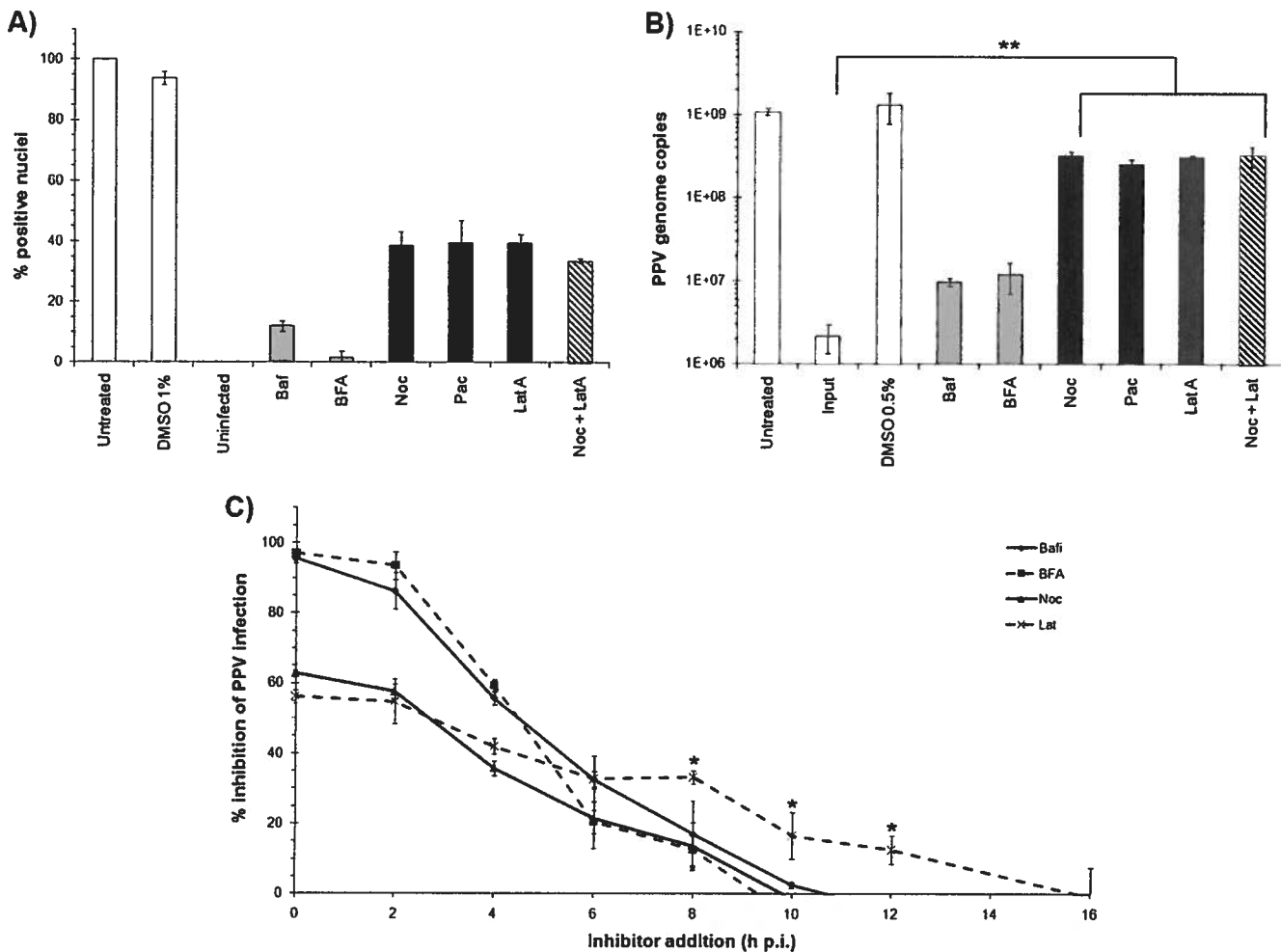


FIG. 4. Cytoplasm trafficking toward the nucleus. (A) Inhibitors of the endosomal pathway and acidification (light shaded bars), microtubules (filled bars), and actin networks (dark shaded bars) were used to evaluate their necessity for PPV infection. Shown are the relative percentages of infection at 20 h p.i. in the presence of optimal concentrations of the inhibitors as measured by indirect IF, as described for Fig. 2. (B) Impacts of the inhibitors on genome replication as measured by qPCR and normalized to cell numbers, as described for Fig. 3 (\*\*,  $P < 0.003$  by the  $t$  test). (C) Pulse inhibition. Inhibitors were added at different times p.i. and were left until 20 h p.i. The percentages of infected cells were determined (\*,  $P < 0.03$  by the  $t$  test for the difference between the Noc and LatA curves).

zine, meaning that they entered preferably via clathrin-mediated endocytosis. Alternatively, infection with aggregates of virus was greatly inhibited by amiloride, indicating that macropinocytosis was more important for those particles. As expected, the level of inhibition of virus in the crude preparation was found to be intermediate between those for the two types of particles, and purified virus acted similarly to single particles. Nevertheless, the infection could not be inhibited by more than 60%, strengthening the hypothesis that an additional, unknown entry pathway would be important for PPV entry.

**Cytoplasmic transport toward the nucleus.** After endocytosis, the viral particles likely proceed in the endosomal pathway. Chemical inhibitors were used to evaluate the implication of these cellular components in PPV infection (Table 1). First, dose-response curves were obtained for each inhibitor (data not shown) as described in "Drug treatments and PPV infection" above, and when these curves were combined with MTT assay results, the optimal concentration of each inhibitor was

determined. As described above, the relative percentages of infected cells were obtained after treatment with the optimal dose of each inhibitor. The results shown in Fig. 4A demonstrate that endosomal acidification and trafficking to the late endosomes were essential for proper PPV infection (inhibition with Baf and BFA). PPV then likely exits the endosomal pathway via its PLA2 activity to reach the cytoplasm, where the main transport pathways to the nucleus are the microtubules (MTs) and actin networks. Transport by the MTs would be more efficient, since they polymerize from the MTOC, located next to the nucleus. Both the MTs and the actin networks were found to be important, although the inhibitors could not completely abolish the infection (Noc and LatA). The dynamic instability of MTs due to polymerization-hydrolysis was also important, since fixation of the MT structure (Pac) also inhibited the infection. These results were confirmed by qPCR, as shown in Fig. 4B.

Pulse inhibition experiments were performed by the addition of inhibitors at different times throughout the infection. This

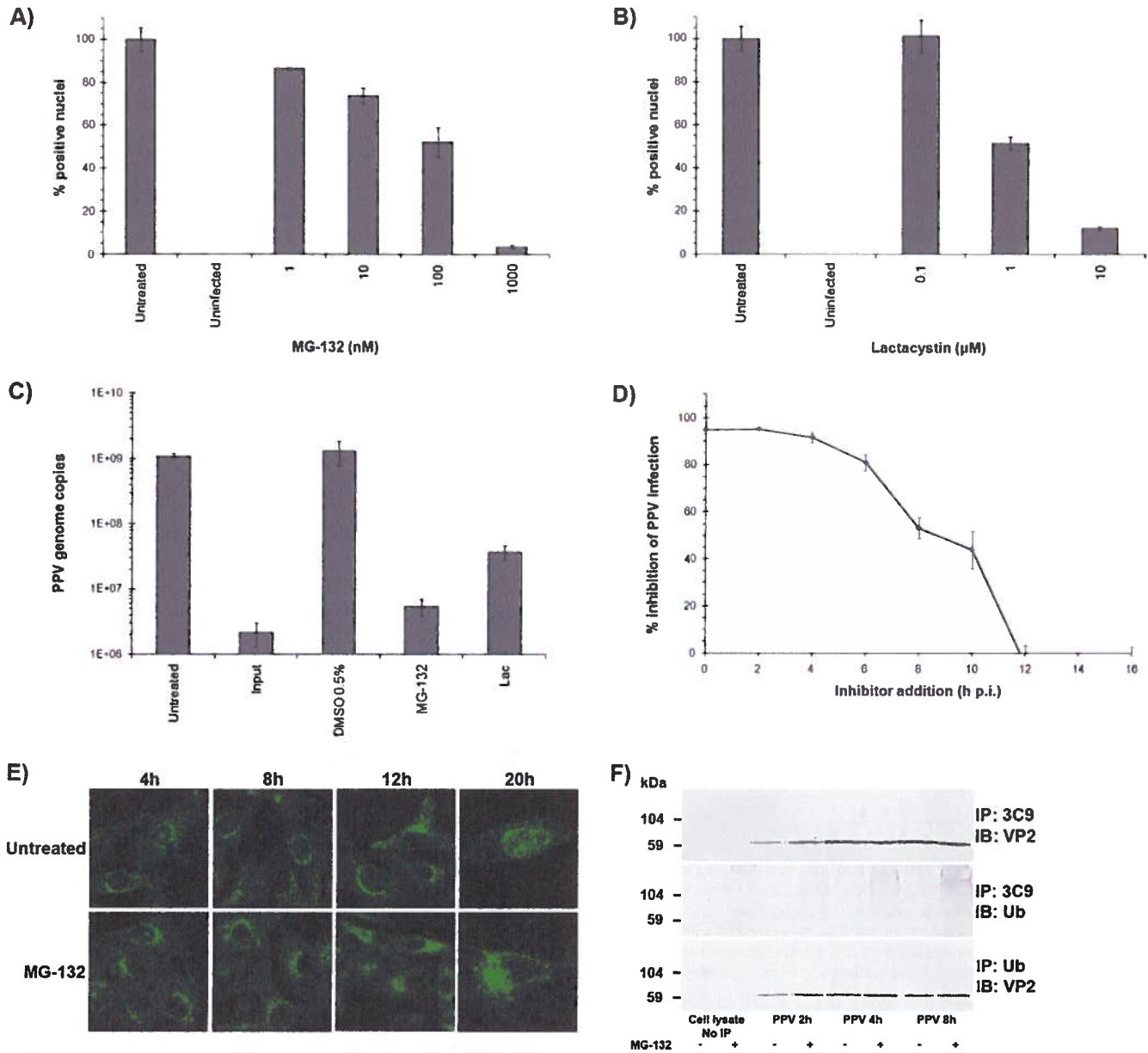


FIG. 5. Proteasome involvement. (A and B) Inhibition of the proteolytic activity of the proteasome aborted PPV infection. The effects of the inhibitors were evaluated by indirect IF experiments as described for Fig. 2 and were expressed as the percentage of infected cells at 20 h p.i. relative to that for mock-treated cells (arbitrarily set at 100%). (C) Cells were treated with inhibitors as for panels A and B, and inhibition of genome replication was measured by qPCR for PPV, normalized to cell numbers, as described for Fig. 3. (D) Pulse inhibition. MG-132 was added at different times throughout the infection until cell fixation, and the percentage of infected cells was determined. (E) Capsid localization in the presence of MG-132. Capsids were visualized at different times throughout the infection by the capsid-specific antibody 3C9. In untreated cells, PPV reached perinuclear localization within 4 h p.i., and new virus was observed in the nucleus at 20 h p.i. The virus was also observed near the nucleus after MG-132-mediated inhibition but remained more diffuse in the cytoplasm (8 to 12 h p.i.), and very few positive nuclei were visible at 20 h p.i. (F) Coimmunoprecipitation of ubiquitin with anti-PPV capsid antibodies and of VP2 capsid proteins with anti-ubiquitin antibodies. Capsid proteins were observed in all ubiquitin precipitations. The ubiquitin signal in the capsid immunoprecipitation was more diffuse, as generally observed for ubiquitinated proteins.

provided an estimation of the period during which the cellular components were important for the infection. As shown in Fig. 4C, the endosomal-pathway inhibitors were effective mostly in the first hours of infection. While the MT inhibitor was also most efficient during the first 10 h, like endosomal-pathway inhibitors, the actin inhibition curve was above the inhibition curve for the MTs, indicating that the actin network remained important later in the infection.

**Proteasome.** The proteasome machinery is critical for host cell defense and can lead to abortive infections via capsid degradation early in infection (13). On the other hand, partial degradation by the proteasome can facilitate some viral infections (47). Two proteasome inhibitors, MG-132 and lactacystin (Table 1), were used to evaluate the impact of the proteasome on PPV infection. As demonstrated in Fig. 5A and B, inhibition of the proteasome almost completely abolished PPV in-

fection. These results were further confirmed by qPCR (Fig. 5C). Pulse inhibition was also performed as described for cytoplasmic trafficking and demonstrated that the proteasome was important up to 12 h of infection (Fig. 5D).

The cellular localization of the virus in the presence of MG-132 was estimated by confocal microscopy. After treatment with the inhibitor, the cells were infected with PPV, fixed at different times during the infection, and processed for indirect immunofluorescence with a capsid-specific antibody (Fig. 5E). In the presence of MG-132, PPV was still able to reach the nuclear periphery, but the capsids remained more diffuse than those in untreated cells. At 20 h p.i., very few virus-positive nuclei were observed, supporting the finding that the infection was not productive.

The best-characterized mechanism by which the proteasome targets proteins is ubiquitination (43). After covalent linkage of several ubiquitin subunits to the targeted protein through lysine residues, the protein is unfolded and fragmented into small subunits that are further degraded by proteases to single amino acids. Coimmunoprecipitation of the viral capsid and ubiquitin showed that PPV capsids were ubiquitinated at 4 to 12 h p.i. (Fig. 5F), coinciding with the passage through the cytoplasm. Ubiquitin was present after the immunoprecipitation of the capsids, in increasing amounts up to 12 h p.i. Conversely, PPV protein was present after ubiquitin immunoprecipitation. When cells were treated with MG-132, a greater amount of ubiquitin was observed in capsid coprecipitation, suggesting that inhibition of proteasomal processing resulted in greater accumulation of ubiquitin-linked capsids early in infection.

## DISCUSSION

Although porcine parvovirus was identified several decades ago, its interactions with host cells remain poorly understood. The early steps of PPV infection were investigated in the current study, since they are the keys to establishing a productive infection. Our data demonstrated both similarities and substantial differences between PPV and other closely or distantly related parvoviruses.

Direct probing of virus endocytosis is commonly achieved using pharmacological inhibitors, because (i) the effect can be easily evaluated and quantified; (ii) the short time of exposure delays side effects or compensatory mechanisms; and (iii) all cells are equally exposed. However, the potential for poor specificity remains a major concern, in particular if the actin cytoskeleton is affected. None of the common inhibitors of the endocytic pathways possesses absolute specificity for the targeted component. Therefore, two inhibitors with different actions were used for each cell pathway. The inhibitors were used at relatively low concentrations in order to minimize side effects. Nevertheless, the interpretation of the results required careful consideration of the degree of selectivity.

Prior treatment of cells with neuraminidase prevented infection, emphasizing the pivotal role of sialic acid receptors in infection. This first binding would occur regardless of the entry mode, since the infection could be almost completely inhibited by treatment of the cells with neuraminidase. Resialation experiments (6, 24) on sialidase-treated cells with the enzyme  $\alpha$ -2,3-*O*-sialyltransferase or  $\alpha$ -2,3-*N*-sialyltransferase, or with a

combination of both enzymes, partially reconstituted infectivity. Thus, the sialylglycoprotein receptors available for virus attachment appear to contain both *O*- and *N*-linked carbohydrate moieties. However, to achieve optimal binding, sialation of the receptors may be more complex than what could be rebuilt *in vitro* (since the combination of the two enzymes could not fully reconstitute viral binding and infection) or may require other specific sialic acid derivatives.

Unexpected results were obtained in the process of deciphering the entry mechanisms of PPV. The entry of the virus into cells could not be completely prevented by any of the chemical inhibitors or by their combination. Inhibition of clathrin or macropinocytosis led to about 50% reduction of the infection. Moreover, even when these inhibitors were used in combination, inhibition was only slightly greater (60%). Accordingly, a third unusual or unknown entry mechanism is likely to be involved for PPV; this will require further investigation. It is also possible that the inhibitor concentrations used failed to completely block the entry pathways. However, dose-response curves and combinations of inhibitors showed that even beyond toxic doses, as many as 40% of cells could still be infected (data not shown). It is unlikely that the remaining levels of infection would be due solely to imperfect inhibition of the cells. It has been reported that chlorpromazine is able to block macropinocytosis in addition to affecting clathrin-coated pits, whereas amiloride and cytochalasin D may also affect endocytosis via clathrin-coated pits (14, 26). However, the contrasting effects of these drugs on isolated and aggregated PPV particles indicated that at the concentrations used, these drugs were sufficiently specific. With less cross-reactivity of these inhibitors, the preference for either coated-pit endocytosis or macropinocytosis by these forms of PPV should be even more significant than the *P* value of <0.003 that was observed.

This work is the first demonstration that macropinocytosis, a nonspecific entry mode, would be an important entry mechanism for a parvovirus. However, since binding to sialic acid moieties was necessary, prior binding with an unknown cell surface receptor may upregulate macropinocytosis (15). Most parvoviruses are known to use clathrin-mediated endocytosis extensively, if not exclusively. Nevertheless, it was recently shown that AAV5 uses both clathrin and caveolar endocytosis to enter cells (1). Inhibition of caveolae had no effect on PPV infection. Canine parvovirus, which uses the transferrin receptor (TfR) for receptor-mediated endocytosis, still infected cells efficiently when deletions or mutations within the cytoplasmic domain of TfR prevented interaction with adapter protein 2, thus abolishing clathrin-mediated uptake (22); this finding suggests the existence of a supplementary entry pathway. Therefore, the entry of these viruses appears to be more complicated than was previously assumed. Moreover, even among closely related parvoviruses, there are significant differences in the first steps of infection.

The observed preference for different entry mechanisms by isolated and aggregated PPV particles is particularly relevant, since most laboratory studies are based on purified virus (e.g., isolated particles) with cell culture, which may not reflect the natural context of infection in the host. Indeed, it is most likely that some aggregates form when cells are destroyed by the virus, and those aggregates would be in contact with neighboring cells.

As demonstrated in this study, endosomal acidification and trafficking to the late endosomes are both essential for PPV, since treatment of the cells with bafilomycin or brefeldin A, respectively, almost completely abolished the infection (Fig. 4). Transport through the endosomal pathway may trigger conformational changes that enable further steps of PPV infection, as shown for MVM (46). Indeed, the amino-terminal part of the VP1 protein must be externalized from the capsid. This capsid protein contains a phospholipase A2 motif, and its activity is essential for breaching vesicular membranes (16). Finally, since endosomes are transported on MTs, which are polarized toward the nucleus, vesicular traffic of PPV to the late endosomes or lysosomes would provide a means for the virus to reach the perinuclear area.

MTs and actin, the two major cell transport structures, were also shown to be involved in PPV infection. Indeed, inhibition of either structure reduced the infection up to 60%. However, since the inhibition was not complete, even when the two inhibitors were combined (Noc plus LatA), it is possible that destruction of the normal cell structure is toxic and hence that total inhibition cannot be achieved without killing the cells. Most interestingly, the virus seemed to utilize each transport structure at different times postinfection. MTs were important mostly in the first 8 to 10 h of infection, correlating with the time frame of endosomal acidification and traffic to the late endosomes. In contrast, the actin network was involved later in the infection, up to 12 to 16 h p.i. These results suggest that MTs are mostly important for the transport of the virus while it is in the endosome pathway, whereas actin could also be involved later in the infection cycle, such as during the transport of the newly synthesized proteins to the nucleus. The effect on the actin network may also indirectly affect the infection.

Proteasome activity was crucial for PPV infection (Fig. 5). In the presence of two commonly used proteasome inhibitors, MG-132 and lactacystin, the virus stayed more diffused in the perinuclear region, and very low replication was observed. These results strongly suggested that interaction with the proteasome occurred during the last transport steps before the delivery of the genome to the nucleus. Moreover, proteasomal processing would take place only in early infection, since addition of the inhibitor at 12 h p.i. had no effect on viral infection. Such a necessity for an interaction with the proteasome has already been demonstrated for MVM (46, 47), in contrast to the inhibitory effect of the proteasome on infection by AAVs (13). Protein degradation by the proteasome proceeds by ubiquitination of the target (28). Coimmunoprecipitation experiments demonstrated that PPV capsid proteins were indeed ubiquitinated early in infection (Fig. 5F), yet no significant degradation of the viral protein could be demonstrated in coimmunoprecipitation experiments (Fig. 5F, lower panel) or by Western blotting performed directly on cell lysates (data not shown). However, since the infectivity ratio of PPV is very low (1 infectious particle for at least 1,000 capsids), we cannot rule out the possibility that degradation remained undetected. Although degradation is a common result of ubiquitination, other purposes, such as differential interaction with cellular components, may be triggered by this modification (30, 34, 65). The exact role of the ubiquitination and proteasomal processing of PPV during entry thus remains to be determined.

In summary, the investigation of PPV entry and transport events within the cell has provided some unique results in comparison with known pathways of parvovirus infection. Indeed, this is the first description of the importance of macropinocytosis as an additional entry portal into cells. These results also highlighted the fact that particle types may play an underestimated role in the preferential uptake of viruses by cells. Taken together, these results may explain why it has been a substantial challenge to identify specific receptors for many viruses, including members of the family *Parvoviridae*.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada to P.T. and by scholarships from the Fondation Armand-Frappier to M.B. and S.F.

We also thank Marcel Desrosiers for technical expertise in confocal microscopy and Micheline Letarte for electronic microscopy.

#### REFERENCES

- Bantel-Schual, U., I. Braspenning-Wesch, and J. Kartenbeck. 2009. Adeno-associated virus type 5 exploits two different entry pathways in human embryo fibroblasts. *J. Gen. Virol.* 90:317–322.
- Barton, E. S., J. L. Connolly, J. C. Forrest, J. D. Chappell, and T. S. Dermody. 2001. Utilization of sialic acid as a coreceptor enhances reovirus attachment by multistep adhesion strengthening. *J. Biol. Chem.* 276:2200–2211.
- Bergeron, J., B. Hebert, and P. Tijssen. 1996. Genome organization of the Kresc strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J. Virol.* 70:2508–2515.
- Bergeron, J., J. Menezes, and P. Tijssen. 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* 197:86–98.
- Bishop, N. E. 2003. Dynamics of endosomal sorting. *Int. Rev. Cytol.* 232:1–57.
- Blackburn, S. D., S. E. Cline, J. P. Hemming, and F. B. Johnson. 2005. Attachment of bovine parvovirus to O-linked  $\alpha$ 2,3 neuraminic acid on glycoprotein A. *Arch. Virol.* 150:1477–1484.
- Brown, K. E., S. M. Anderson, and N. S. Young. 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* 262:114–117.
- Canaan, S., Z. Zadoti, F. Ghomashchi, J. Bollinger, M. Sadilek, M. E. Moreau, P. Tijssen, and M. H. Gelb. 2004. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *J. Biol. Chem.* 279:14502–14508.
- Carroll, S. M., H. H. Hign, and J. C. Paulson. 1981. Different cell-surface receptor determinants of antigenically similar influenza virus hemagglutinins. *J. Biol. Chem.* 256:8357–8363.
- Chiorini, J. A. 2006. Looking down the rabbit hole: understanding the binding, entry, and trafficking patterns of AAV particles in the cell. p. 165–170. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 2007. Parvoviral host range and cell entry mechanisms. *Adv. Virus Res.* 70:183–232.
- Delboy, M. G., D. G. Roller, and A. V. Nicola. 2008. Cellular proteasome activity facilitates herpes simplex virus entry at a postpenetration step. *J. Virol.* 82:3381–3390.
- Douar, A. M., K. Poulard, D. Stockholm, and O. Danos. 2001. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J. Virol.* 75:1824–1833.
- Elferink, J. G. 1979. Chlorpromazine inhibits phagocytosis and exocytosis in rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Pharmacol.* 28:965–968.
- Falcone, S., E. Cocucci, P. Podini, T. Kirchhausen, E. Clementi, and J. Meldolesi. 2006. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* 119:4758–4769.
- Farr, G. A., L. G. Zhang, and P. Tattersall. 2005. Parvoviral virions deploy a capsid-tethered lipolytic enzyme to breach the endosomal membrane during cell entry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:17148–17153.
- Govindasamy, L., K. Hueffer, C. R. Parrish, and M. Agbandje-McKenna. 2003. Structures of host range-controlling regions of the capsids of canine and feline parvoviruses and mutants. *J. Virol.* 77:12211–12221.
- Greber, U. F., and M. Way. 2006. A superhighway to virus infection. *Cell* 124:741–754.
- Harblson, C. E., S. M. Lyl, W. S. Welchert, and C. R. Parrish. 2009. Early steps in cell infection by parvoviruses: host-specific differences in cell receptor binding but similar endosomal trafficking. *J. Virol.* 83:10504–10514.
- Harding, M. J., and T. W. Molitor. 1992. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Arch. Virol.* 123:323–333.



21. Hueffer, K., L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, and C. R. Parrish. 2003. Combinations of two capsid regions controlling canine host range determine canine transferrin receptor binding by canine and feline parvoviruses. *J. Virol.* 77:10099–10105.
22. Hueffer, K., L. M. Palermo, and C. R. Parrish. 2004. Parvovirus infection of cells by using variants of the feline transferrin receptor altering clathrin-mediated endocytosis, membrane domain localization, and capsid-binding domains. *J. Virol.* 78:5601–5611.
23. Hueffer, K., J. S. Parker, W. S. Weichert, R. E. Geisel, J. Y. Sgro, and C. R. Parrish. 2003. The natural host range shift and subsequent evolution of canine parvovirus resulted from virus-specific binding to the canine transferrin receptor. *J. Virol.* 77:1718–1726.
24. Johnson, F. B., L. B. Fenn, T. J. Owens, L. J. Faucheux, and S. D. Blackburn. 2004. Attachment of bovine parvovirus to sialic acids on bovine cell membranes. *J. Gen. Virol.* 85:2199–2207.
25. Jones, A. T. 2007. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J. Cell. Mol. Med.* 11:670–684.
26. Kaksonen, M., C. P. Toret, and D. G. Drubln. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:404–414.
27. Kerr, J. R., S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.). 2006. *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
28. Kornitzer, D., and A. Ciechanover. 2000. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell. Physiol.* 182:1–11.
29. Lajole, P., and I. R. Nabl. 2007. Regulation of raft-dependent endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* 11:644–653.
30. Lin, L., and S. Ghosh. 1996. A glycine-rich region in NF- $\kappa$ B p105 functions as a processing signal for the generation of the p50 subunit. *Mol. Cell. Biol.* 16:2248–2254.
31. López-Bueno, A., M. P. Rubio, N. Bryant, R. McKenna, M. Agbandje-McKenna, and J. M. Almendral. 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J. Virol.* 80:1563–1573.
32. Mani, B., C. Baltzer, N. Valle, J. M. Almendral, C. Kempf, and C. Ros. 2006. Low pH-dependent endosomal processing of the incoming parvovirus minute virus of mice virion leads to externalization of the VP1 N-terminal sequence (N-VP1), N-VP2 cleavage, and uncoating of the full-length genome. *J. Virol.* 80:1015–1024.
33. Mayor, S., and R. E. Pagano. 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:603–612.
34. Mukhopadhyay, D., and H. Riezman. 2007. Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science* 315:201–205.
35. Muro, S., R. Wlewrodt, A. Thomas, L. Konlaris, S. M. Albelda, V. R. Muzykantov, and M. Koval. 2003. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J. Cell Sci.* 116:1599–1609.
36. Nam, H. J., B. Gurda-Whitaker, W. Y. Gan, S. Ilaria, R. McKenna, P. Mehta, R. A. Alvarez, and M. Agbandje-McKenna. 2006. Identification of the sialic acid structures recognized by minute virus of mice and the role of binding affinity in virulence adaptation. *J. Biol. Chem.* 281:25670–25677.
37. Norkin, L. C. 1999. Simian virus 40 infection via MHC class I molecules and caveolae. *Immunol. Rev.* 168:13–22.
38. Nüesch, J. P., S. Lachmann, and J. Rommelaere. 2005. Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* 331:159–174.
39. Pakkanen, K., E. Salonen, A. R. Makela, C. Oker-Blom, I. Vattulainen, and M. Vuento. 2009. Desipramine induces disorder in cholesterol-rich membranes: implications for viral trafficking. *Phys. Biol.* 6:046004.
40. Parker, J. S., W. J. Murphy, D. Wang, S. J. O'Brien, and C. R. Parrish. 2001. Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J. Virol.* 75:3896–3902.
41. Parker, J. S., and C. R. Parrish. 2000. Cellular uptake and infection by canine parvovirus involves rapid dynamin-regulated clathrin-mediated endocytosis, followed by slower intracellular trafficking. *J. Virol.* 74:1919–1930.
42. Perrais, D., and C. J. Merrifield. 2005. Dynamics of endocytic vesicle creation. *Dev. Cell* 9:581–592.
43. Pickart, C. M. 2001. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 70:503–533.
44. Radtke, K., K. Dohner, and B. Sodelk. 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell. Microbiol.* 8:387–400.
45. Rappoport, J. Z. 2008. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 412:415–423.
46. Ros, C., C. J. Burkhardt, and C. Kempf. 2002. Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J. Virol.* 76:12634–12645.
47. Ros, C., and C. Kempf. 2004. The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* 324:350–360.
48. Sandvig, K., M. L. Torgersen, H. A. Raa, and B. van Deurs. 2008. Clathrin-independent endocytosis: from nonexisting to an extreme degree of complexity. *Histochem. Cell Biol.* 129:267–276.
49. Simpson, A. A., B. Hebert, G. M. Sullivan, C. R. Parrish, Z. Zadori, P. Tijssen, and M. G. Rossmann. 2002. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J. Mol. Biol.* 315:1189–1198.
50. Suikkanen, S., T. Aaltonen, M. Nevalainen, O. Vallehto, L. Lindholm, M. Vuento, and M. Vihinen-Ranta. 2003. Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J. Virol.* 77:10270–10279.
51. Suikkanen, S., M. Antila, A. Jaatinen, M. Vihinen-Ranta, and M. Vuento. 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* 316:267–280.
52. Suikkanen, S., K. Saajarvi, J. Hirsimaki, O. Vallehto, H. Reunanen, M. Vihinen-Ranta, and M. Vuento. 2002. Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J. Virol.* 76:4401–4411.
53. Swanson, J. A., and C. Watts. 1995. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* 5:424–428.
54. Szelel, J., Z. Zadori, and P. Tijssen. 2006. Porcine parvovirus, p. 435–445. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
55. Tattersall, P. 2006. The evolution of parvovirus taxonomy, p. 5–14. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
56. Teale, A., S. Campbell, N. Van Buuren, W. C. Magee, K. Watmough, B. Couturier, R. Shipclark, and M. Barry. 2009. Orthopoxviruses require a functional ubiquitin-proteasome system for productive replication. *J. Virol.* 83:2099–2108.
57. Tullis, G. E., L. R. Burger, and D. J. Pintel. 1993. The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J. Virol.* 67:131–141.
58. Varki, N. M., and A. Varki. 2007. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab. Invest.* 87:851–857.
59. Vendeville, A., M. Ravallec, F. X. Jousset, M. Devise, D. Mutuel, M. Lopez-Ferber, P. Fournier, T. Dupressoir, and M. Ogliastro. 2009. Dengue virus infectious pathway requires clathrin-mediated endocytosis followed by trafficking to the nucleus. *J. Virol.* 83:4678–4689.
60. Vihinen-Ranta, M., A. Kalela, P. Mäkinen, L. Kakkola, V. Marjomäki, and M. Vuento. 1998. Intracellular route of canine parvovirus entry. *J. Virol.* 72:802–806.
61. Vihinen-Ranta, M., and C. R. Parrish. 2006. Cell infection processes of autonomous parvoviruses, p. 157–163. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
62. Vihinen-Ranta, M., W. Yuan, and C. R. Parrish. 2000. Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J. Virol.* 74:4853–4859.
63. Weigel-Kelley, K. A., M. C. Yoder, and A. Srivastava. 2003.  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of  $\beta$ 1 integrin for viral entry. *Blood* 102:3927–3933.
64. Weltzman, M. D. 2006. The parvovirus life cycle: an introduction to molecular interactions important for infections, p. 143–156. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, R. M. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
65. Welchman, R. L., C. Gordon, and R. J. Mayer. 2005. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:599–609.
66. Wilhelm, S., P. Zimmermann, H. J. Selbütz, and U. Truyen. 2006. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J. Virol. Methods* 134:257–260.
67. Yu, G. Y., and M. M. Lal. 2005. The ubiquitin-proteasome system facilitates the transfer of murine coronavirus from endosome to cytoplasm during virus entry. *J. Virol.* 79:644–648.
68. Zádori, Z., J. Szelel, M. C. Lacoste, Y. Li, S. Garlepy, P. Raymond, M. Allaire, I. R. Nabl, and P. Tijssen. 2001. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell* 1:291–302.

# **Annexe II**

Présence de virus apparentés au Parvovirus4 (PARV4) dans les produits sanguins

## Résumé de l'Annexe II

Szelei, J., Liu, K., Li Y., Fernandes, S. and Tijssen, P. (2010). Parvovirus 4-like Virus in Blood Products. *Emerging Infectious Diseases*. 16 (3): 561-4.

Des préparations de plasma et de facteur VIII porcins ont été criblées pour la présence de virus apparentés au Parvovirus 4 (PARV4). Bien que la prévalence de ces types de virus était faible dans les échantillons de plasma, ceux-ci semblent être concentrés au cours du processus d'apprêtement du facteur VIII. L'analyse phylogénique des virus apparentés au PARV4 d'origine humaine et porcine a démontré que ceux-ci ont co-évolués avec leurs hôtes.

# Parvovirus 4-like Virus in Blood Products

Jozsef Szelei, Kaiyu Liu, Yi Li, Sandra Fernandes, and Peter Tijssen

Porcine plasma and factor VIII preparations were screened for parvovirus 4 (PARV)-like viruses. Although the prevalence of PARV4-like viruses in plasma samples was relatively low, viruses appeared to be concentrated during manufacture of factor VIII. PARV4-like viruses from human and porcine origins coevolved likewise with their hosts.

In 2005, a previously unknown virus, parvovirus 4 (PARV4), was detected in a plasma sample from a hepatitis B-positive injection drug user (IDU) (1). Although PARV4 was subsequently detected in plasma from healthy donors, its prevalence is higher in samples from IDUs, AIDS patients, and hepatitis C virus-infected persons (2,3). In recent serologic studies, 67% of HIV-infected IDUs had antibodies to PARV4, whereas non-IDU controls were seronegative (4). This increased prevalence in IDUs and persons with hemophilia most likely reflects parenteral transmission of the virus (4,5). Furthermore, PARV4 was frequently detected in human coagulation factor concentrates prepared from older plasma samples (6). The lower detection frequency in current concentrates may be due to exclusion of high-risk batches, e.g., from IDU or hepatitis C virus-infected persons during plasma collection, and to improved purification methods. The presence of PARV4 in plasma suggests a viremic phase enabling spread of the virus to different organs. Even though recent studies by Kleinman et al. indicate that parvovirus B19 is not readily transmitted to susceptible hosts by blood component transfusion, similar evaluation of PARV4 transmission will be invaluable in assessing the need to routinely screen for this emerging virus (7).

PARV4 contains a 5-kb single-stranded DNA genome with inverted terminal repeats and a large open reading frame (ORF) in each half of the genome coding for nonstructural (NS) protein and structural protein, respectively. PARV4-like viruses form a separate cluster among the parvoviruses (1,8). Three genotypes of human PARV4 parvoviruses with ≈93% nucleotide sequence

identity have been described. The sequence of genotype 1 (PARV4-g1) is highly conserved, whereas that of genotype 2 (PARV4-g2 [formerly PARV5]) is somewhat more diverse. PARV4-g2 is found mostly in older coagulation factor concentrates (1960s–1980s), suggesting that genotype 1 emerged recently (6,8). A third genotype (PARV4-g3) was isolated from persons in sub-Saharan Africa (9). Additionally, PARV4-like viruses with a 60%–65% nucleotide identity were recently identified at high frequencies in porcine and bovine tissue samples in People's Republic of China (10).

In this study, porcine plasma samples and factor VIII (FVIII) concentrates used by persons with hemophilia who have autoimmune antibodies against human FVIII were investigated for PARV4-like viruses. We then determined the degree of identity of these isolates with the human virus.

## The Study

Plasma samples from healthy pigs were collected in Great Britain in 2001. Initially, these samples were tested for PARV4-like viruses by using previously described degenerate PCR primers (10). DNA was extracted from samples by using the High Pure DNA Isolation

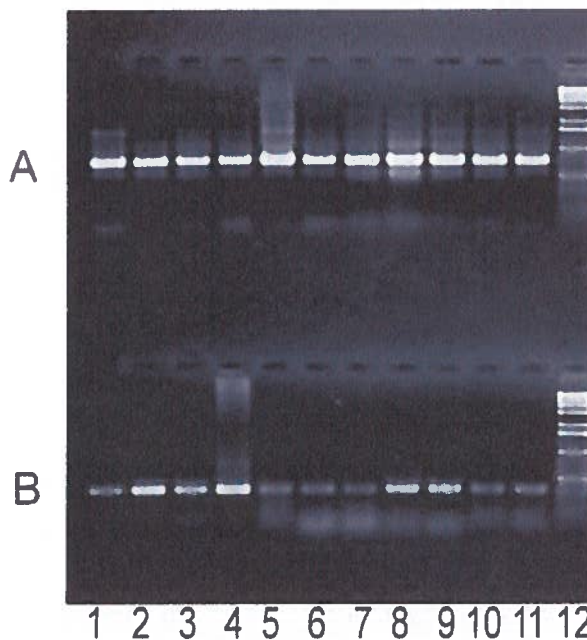


Figure 1. Parallel PCR amplification of PARV4-like (A) and PPV (B) by using purified DNA from clotting FVIII preparations. The results of this PCR usually suggested a higher PARV4 load despite the higher efficiency of the PPV PCR (J. Szelei and P. Tijssen, unpub. data). This finding was confirmed with the quantitative MIMIC PCR method for PPV (11). Numbers indicate different lots of FVIII prepared in 1:1994A, 2:1994B, 3:1996A, 4:1996B, 5:1999, 6:2000A, 7:2000B, 8:2001A, 9:2001B, 10:2001C, 11:2001D, and 12: DNA marker (1-kb ladder; Invitrogen, Carlsbad, CA USA). PARV4, parvovirus 4; PPV, porcine parvovirus; FVIII, factor VIII.

Author affiliations: Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec, Canada (J. Szelei, K. Liu, Yi Li, S. Fernandes, P. Tijssen); and Central People's Republic of China Normal University, Wuhan, People's Republic of China (Y. Li)

DOI: 10.3210/eid1603.090746

Table 1. Percentage diversity of genome sequences of PARV4-like viruses\*†

Genotype	PARV4-p	PHoV	BHoV	PARV4-g1	PARV4-g2
PARV4-p	98–99				
PHoV	97–98	98–99			
BHoV	62	62	99		
PARV4-g1	58	58	60	98–100	
PARV4-g2	58–59	58	59–60	91–92	96–99
PARV4-g3	58	58	60	92	91–92

\*PARV4, parvovirus type 4; PARV4-p, porcine PARV4; PHoV, porcine hokovirus; BHoV, bovine hokovirus; PARV4-g1, PARV4 genotype 1; PARV4-g2, PARV4 genotype 2; PARV4-g3, PARV4 genotype 3.

†Pairwise sequence comparisons were performed by using the ClustalW program ([www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw)) as described in Figure 2 and percentages of sequence identities were calculated. Nucleotide sequences representing the equivalent regions (position 248–5088, numbered according to the PARV4 sequence NC\_007018) were used to align the DNA fragments.

Kit (Roche Applied Science, Roche Diagnostics Canada; Laval, Quebec, Canada). Only 3 of the 98 plasma samples contained detectable amounts of PARV4-like viruses. To further study these porcine viruses, we obtained nearly full-length genomes from overlapping PCR fragments. Primers designed for these PCRs were PrS1: 5'-CCACACCTACCTCGCCTATAAGAATCAG-3'; PrAS1: 5'-CTCCAATTGTTTCAGCACGGGATCC-3'; PrS2: 5'-CCACGAGCTGGAAGTCTTTA-3'; PrAS2: 5'-GGAGTCCGCATACCCATAACAGGCTG-3'; PrS3: 5'-GTGTACCGCAGTGGGAGCCATG-3'; and PrAS3: 5'-TTCTGGCAACCCACTGATCAGAAGG-3'. The nearly full-length clones were sequenced by primer-walking. Ge-

nomics analysis confirmed that these viruses were related to the PARV4 viruses and were close relatives of the recently identified porcine hokoviruses (PHoVs) (10).

We also confirmed the moderate frequency of PARV4-like viremia in the previously tested pig plasma samples with a more sensitive PCR assay by using specific primers PrS4 (5'-AGTTACGGGGGACCGCTACAGTG-3') and PrAS3. In contrast, examination of 11 commercial clotting FVIII preparations showed that all of these independent lots contained substantial amounts of PARV4-like parvovirus, whereas the level of porcine parvovirus DNA was generally lower in the corresponding samples (Figure 1). Similar to the plasma samples, long overlapping PCR frag-

Table 2. Analysis of relationships among the protein sequences of PARV4-like viruses\*†

Sequence	PARV4-p	PHoV	BHoV	PARV4-g1	PARV4-g2	PARV4-g3
<b>PARV4-p</b>						
NS	99–100	(99)	(80)	(68)	(68)	(68)
VP	99–100	(99)	(79)	(77)	(78)	(77)
SAT	100					
<b>PHoV</b>						
NS	97–98	98–99	(79)	(68)	(68)	(68)
VP	99	99	(79)	(77)	(77)	(77)
SAT	98–100	98–100				
<b>BHoV</b>						
NS	67–68	67	99	(70)	(70)	(70)
VP	66	66	NA	(78)	(78)	(78)
SAT	79	79	100			
<b>PARV4-g1</b>						
NS	53–55	53–54	56–57	96–99	(99)	(98)
VP	65	65	65	99	(99)	(98–99)
SAT	59	59	59	100		
<b>PARV4-g2</b>						
NS	54–55	53–54	56	96–97	98–99	(98)
VP	65	65	64–65	98	98–99	(98)
SAT	59	59	59	100	100	
<b>PARV4-g3</b>						
NS	54	53–54	56	96–97	96–97	NA
VP	65	65	64	98	97–98	NA
SAT	59	59	59	100	100	

\*PARV4, parvovirus type 4; PARV4-p, porcine PARV4; PHoV, porcine hokovirus; BHoV, bovine hokovirus; PARV4-g1, PARV4 genotype 1; PARV4-g2, PARV4 genotype 2; PARV4-g3, PARV4 genotype 3; NS, nonstructural protein; VP, viral protein; NA, no alignment; SAT, small alternatively translated proteins.

†Numbers indicate percentages of amino acid sequence identity; numbers in parentheses indicate percentages of amino acid similarity (preserved physicochemical properties). Sequence similarity was not calculated for the SAT proteins, because of their relatively smaller size. When only 1 sequence was available (e.g., VP of BHoV), no alignment was performed.

ments were amplified from the FVIII preparations to obtain nearly full-length sequences. Their analysis provided information about the evolution of PARV4-like viruses, during nearly a decade, in pigs. Sequence data were registered by GenBank (accession nos. CI2001A: FJ982246; CI2001B: FJ982247; CI2001C: FJ982248; F8-1994A: FJ982249; F8-1994B: FJ982250; F8-1996A: FJ982251; F8-1996B: FJ982252; F8-1999: FJ982253; F8-2000A: FJ982254; and F8-2000B: FJ982255). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted by using MEGA version 4 (12).

The genomes of these newly isolated PARV4-like viruses were similar to the PHoVs previously identified in Hong Kong Special Administrative Region, People's

Republic of China. Although, these new isolates showed some diversity (98%–99% identity), they differed somewhat more from the PHoVs (97%–98% identity). The viral protein (VP)-ORF was highly conserved (99%), whereas the NS-ORF showed more diversity (97%–98%). Genomic and protein-coding sequences were also compared with other PARV4-like viruses (Tables 1, 2). Phylogenetic analysis using neighbor-joining and maximum parsimony methods demonstrated that PHoVs grouped together, whereas PARV4-like sequences from FVIII prepared at different times were less uniform (Figure 2). Older FVIII PARV4 contaminants (especially from 1994) were related more closely to the bovine hokoviruses (BHoVs) and to PARV4-g2. Finally, analysis of the newly identified virus genomes

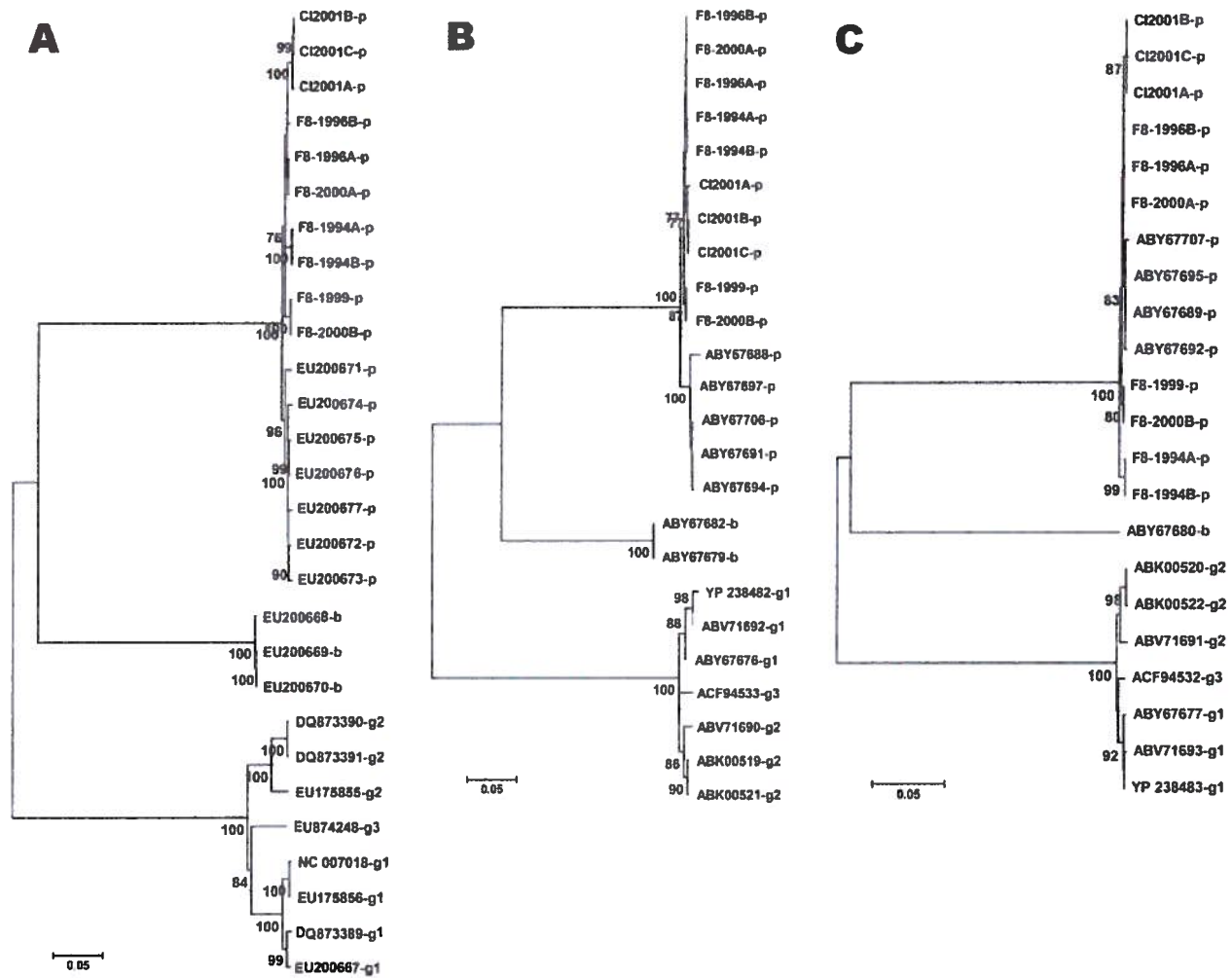


Figure 2. Construction of phylogenetic trees for newly identified porcine viruses and comparison with previously identified prototype parvovirus 4 (PARV4)-like sequences. Sequences of other PARV4-like viruses indicated by the accession numbers were obtained from GenBank, and their origins are marked by letters (p, porcine; b, bovine; PARV4-g1, g2, g3, human parvovirus 4 genotypes 1, 2, and 3). ClustalW-aligned genomes (A) and nonstructural (NS) protein (B) and viral protein (VP) (C) were all trimmed to obtain sequences with similar lengths. All computer analysis was performed by using the neighbor-joining method. Branches corresponding to partitions reproduced in <70% bootstrap replicates are collapsed. The tree is drawn to scale, and the percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown below the branches. F8-year, year of the factor VIII lot; CI-year, plasma samples and year of collection. Scale bar represents the number of nucleotide (A) or amino acid (B, C) substitutions per site.

showed an alternative coding sequence inside of the VP gene with a recognizable relationship to small alternatively translated proteins (SAT) (13). In the porcine PARV4-like viruses, the start codon for the SAT protein was 3 nt downstream relative to the position of SAT-ATG in the human and bovine PARV4 viruses. Although the SAT protein was 67 aa in all the characterized human PARV4 viruses, porcine and bovine PARV-like viruses contained SAT proteins with 84 aa. The amino acid sequences of the SAT proteins were highly conserved in each PARV4 virus group; however, they differed greatly between PARV4 viruses belonging to different host species (Table 2).

### Conclusions

Improved virus detection methods have facilitated the discovery of new viruses and have provided insight into the existence of a wide variety of potentially pathogenic strains in biopharmaceutical products. Plasma samples, collected from individual pigs in 2001–2002, and FVIII samples, prepared during 1994–2001, were tested for PARV4-like viruses.

Sequence analysis showed that PARV4-like viruses may have undergone some degree of selective pressure during this time because the genomes sequenced showed a greater variability than the porcine parvovirus NS sequences isolated from the same samples (J. Szelei and P. Tijssen, unpub. data). In the current study, comparison of the genomic and NS protein coding sequences indicated that viruses in the older samples were more closely related to BHoV and PARV4-g2 (Figure 2). Fewer changes were observed in the VP coding sequence (Table 2). Because VPs are responsible for the entry of parvoviruses, they usually adapt to host-specific receptor(s). The presence of PARV4-g2-like isolates in older samples and the omnipresence of PARV4-like viruses in more recent samples suggested that the porcine PARV4-like virus and human PARV4 may have similarly evolved (8). These new parvovirus isolates from Great Britain would belong to a different cluster of porcine PARV4-like viruses than the hokoviruses from Hong Kong Special Administrative Region.

Although older isolates shared more identity with BHoV and PARV4-g2, the substantial differences in the DNA sequences of PARV4-like viruses from different species (human, bovine, pig) suggested that they would have diverged a long time ago. This hypothesis was also supported by the sequence stabilization of the SAT proteins, which may play important host-specific roles in the viral exit (13). Nevertheless, the existence of a wide variety of different PARV4 strains, most of which result in chronic infections, could provide a basis for an evolutionary jump and recombination and should raise major concerns about the dangers of parenteral transmission.

This research was supported by a grant to P.T. from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada.

Dr Szelei is senior research associate at the Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier. His work focuses on the molecular biology of parvoviruses.

### References

1. Jones MS, Kapoor A, Lukashov VV, Simmonds P, Hecht F, Delwart E. New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol*. 2005;79:8230–6. DOI: 10.1128/JVI.79.13.8230-8236.2005
2. Fryer JF, Delwart E, Bernardin F, Tuke PW, Lukashov VV, Baylis SA. Analysis of two human parvovirus PARV4 genotypes identified in human plasma for fractionation. *J Gen Virol*. 2007;88:2162–7. DOI: 10.1099/vir.0.82620-0
3. Longhi E, Bestetti G, Acquaviva V, Foschi A, Piolini R, Meroni L, et al. Human parvovirus 4 in the bone marrow of Italian patients with AIDS. *AIDS*. 2007;21:1481–3. DOI: 10.1097/QAD.0b013e3281e38558
4. Sharp CP, Lail A, Donfield S, Simmons R, Leen C, Klenerman P, et al. High frequencies of exposure to the novel human parvovirus PARV4 in hemophiliacs and injection drug users, as detected by a serological assay for PARV4 antibodies. *J Infect Dis*. 2009;200:1119–25. DOI: 10.1086/605646
5. Simmonds P, Manning A, Kenneil R, Carnie FW, Bell JE. Parenteral transmission of the novel human parvovirus PARV4. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:1386–8.
6. Schneider B, Fryer JF, Oldenburg J, Brackmann HH, Baylis SA, Eis-Hübinger AM. Frequency of contamination of coagulation factor concentrates with novel human parvovirus PARV4. *Haemophilia*. 2008;14:978–86. DOI: 10.1111/j.1365-2516.2008.01800.x
7. Kleinman SH, Glynn SA, Lee TH, Tobler LH, Schlumpf KS, Todd DS, et al. A linked donor-recipient study to evaluate parvovirus B19 transmission by blood component transfusion. *Blood*. 2009;114:3677–83. DOI: 10.1182/blood-2009-06-225706
8. Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus. *J Infect Dis*. 2007;195:1345–52. Medline DOI: 10.1086/513280
9. Simmonds P, Douglas J, Bestetti G, Longhi E, Antinori S, Parravicini C, et al. A third genotype of the human parvovirus PARV4 in sub-Saharan Africa. *J Gen Virol*. 2008;89:2299–302. DOI: 10.1099/vir.0.2008/001180-0
10. Lau SK, Woo PC, Tse H, Fu CT, Au WK, Chen XC, et al. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J Gen Virol*. 2008;89:1840–8. DOI: 10.1099/vir.0.2008/000380-0
11. Zádori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Gariépy S, Raymond P, et al. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell*. 2001;1:291–302. DOI: 10.1016/S1534-5807(01)00031-4
12. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol*. 2007;24:1596–9. DOI: 10.1093/molbev/msm092
13. Zádori Z, Szelei J, Tijssen P. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J Virol*. 2005;79:13129–38. DOI: 10.1128/JVI.79.20.13129-13138.2005

Address for correspondence: Peter Tijssen, Institut National de la Recherche Scientifique–Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 Blvd des Prairies, Laval, Québec H7V 1B7, Canada; email: peter.tijssen@iaf.inrs.ca

## **Annexe III**





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yabio](http://www.elsevier.com/locate/yabio)

## Notes &amp; Tips

## Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA

S. Fernandes, P. Tijssen \*

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

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 28 August 2008

Available online 11 October 2008

## ABSTRACT

The use of synthetic DNA can avoid problems that are sometimes encountered with conventional molecular biology techniques using DNA with high GC content, strong secondary structures, or repeat sequences. However, very complex DNA may still resist PCR and synthesis of DNA from oligonucleotides. In the method described here, separately synthesized DNA segments were seamlessly joined independently of the presence of restriction sites in the target DNA. This method allowed the reconstruction of complex DNA by concatenation of easily synthesized segments and permitted repeated swapping of segments, from a few nucleotides to large fragments of complex DNA for phenotypic analysis.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Synthetic genes or genomes have become increasingly convenient tools to optimize protein expression or to obtain DNA chimeras to study regulatory elements by their related phenotypes. Chemical synthesis of DNA is usually achieved efficiently by assembly of synthetic oligonucleotides by (asymmetric) polymerase chain reaction (PCR)<sup>1</sup> [1–4]. Problems arise, however, with complex secondary structures such as tight extensive hairpins that resist reliable PCR-mediated recombination, repeats, and when restriction sites are lacking. Likewise, approaches to obtain chimeras of DNA by conventional methods used in molecular biology, such as PCR-mediated recombination, usually fail with such DNA. An example of complex DNA is the right-hand terminus of the porcine parvovirus (PPV) genome. The 5' end of this single-stranded DNA (minus strand) forms a hairpin of 220 nt with a high GC content and is almost perfectly base-paired except for a bubble of a few nucleotides that correspond to the dyad symmetry nucleotides when a cruciform structure is assumed [5,6] (Fig. 1A). Furthermore, this hairpin is preceded by a repeat of 127 nt and no suitable restriction sites are present in the terminal 1 kb of this genome, thereby preventing the use of conventional methods to swap segments from different strains for phenotypic analysis.

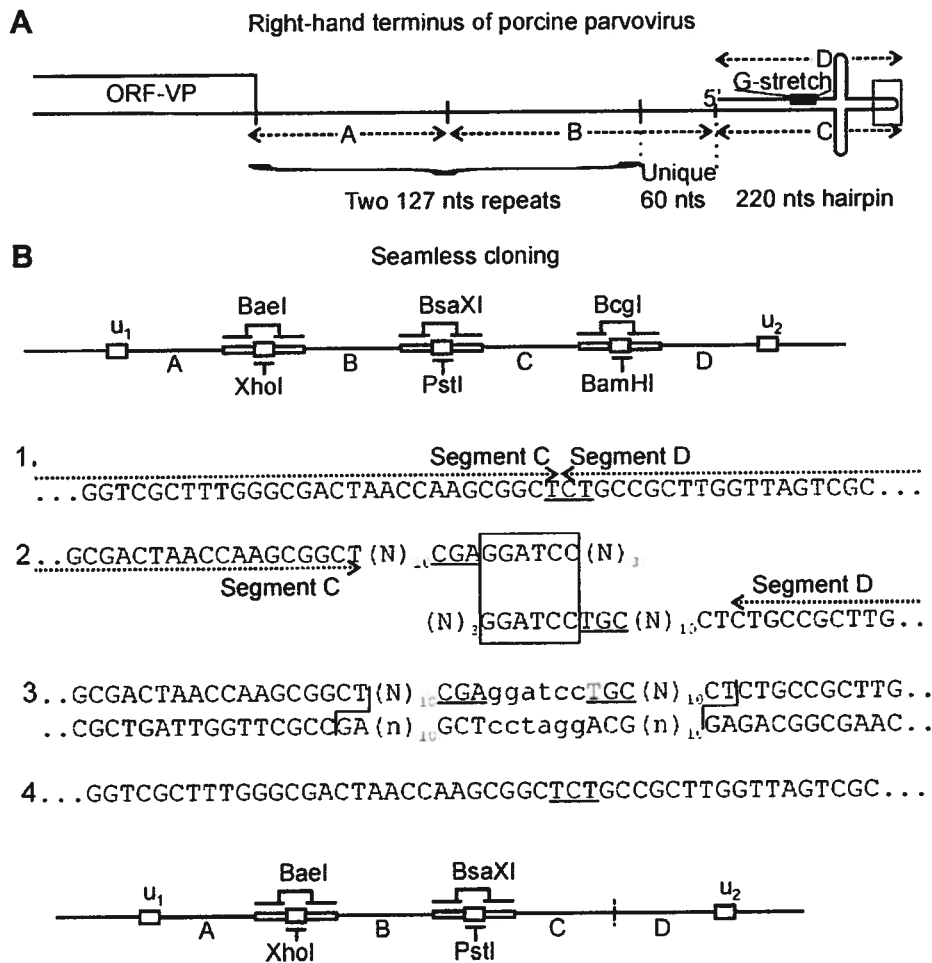
To study the different elements in this noncoding terminal region of more than 500 nt, chimeras needed to be made of the DNA from different virus strains that could then be introduced in the infectious clone (i.e., plasmid containing the complete viral genome that will produce virus upon transfection into susceptible host cells) for phenotypic studies. Moreover, these clones were required to be highly stable to prevent knockout of critical elements and overgrowth of fitter mutants.

The method used to overcome these problems consisted of synthesizing the different segments that do not pose a problem individually and then connecting them by seamless cloning using recently discovered type IIB restriction endonucleases [7,8]. These enzymes recognize bipartite sequences (Table 1) and cut at either side of the recognition site to release the enzyme on a short DNA fragment (30–35 nt depending on the enzyme). For example, the *BcgI* restriction enzyme recognizes the discontinuous sequence CGA(N)<sub>6</sub>TGC and cleaves the DNA substrate twice, at 10 nt from each end of the recognition site, leaving two 2-base 3' overhangs and excising a 34-bp fragment from the targeted DNA segment. The (N)<sub>6</sub> within the discontinuous recognition sequence of the type IIB enzyme allows the internal placement of another restriction site to specifically recreate the *BcgI* recognition sequence by joining segments that each contain half of the type IIB enzyme recognition site. Because many restriction sites can be chosen for (N)<sub>6</sub>, different sites can be designed at either end of the segment when multiple fragments need to be connected. Obviously, the approach of inserting type IIB enzyme half-sites at the ends of synthetic DNA is also possible for PCR fragments by designing primers in the same fashion.

As illustrated in Fig. 1B, four DNA segments (A–D) of the right-hand terminus of the PPV genome were synthesized. Each synthetic DNA segment was designed to carry at its terminus half a restriction site of the type IIB enzyme and a cloning site. For example, the synthetic left half (segment C) and right half (segment D) of the 220-nt hairpin to be connected contained extra sequences of 10 nt, half a *BcgI* site, and a *Bam*HI site. Moreover, segment D contained a 2-nt overlap with segment C. Connecting these segments through *Bam*HI by standard cloning methods reconstituted the full *BcgI* site. Digestion with *BcgI* allowed precise excision of the extra sequences and, after religation, generated the desired original sequence (Fig. 1B). The adjacent segments, corresponding to the “unique” and variable “repeat” sequences (segments B and

\* Corresponding author. Fax: +1 450 686 5627.

E-mail address: [peter.tijssen@iaf.inrs.ca](mailto:peter.tijssen@iaf.inrs.ca) (P. Tijssen).<sup>1</sup> Abbreviations used: PCR, polymerase chain reaction; PPV, porcine parvovirus.



**Fig. 1.** Principles of seamless cloning and domain swapping. (A) The right terminus of a parvovirus genome is an example of DNA that resists PCR. Although it could not be synthesized as a whole domain, individual segments can be synthesized, as illustrated around the dyad symmetry (boxed). (B) A large number of segments can be introduced in a single vector when different type IIB enzymes are used. A set of clones in which these fragments can still be swapped can be generated (u is a unique restriction site useful to transfer the whole insert to, e.g., an infectious clone). Line 1 shows the sequence of segments C and D around the dyad sequence (underlined) that were synthesized separately (line 2) while adding *BcgI* half-sites (CGA and TGC, respectively [underlined]) and a *BamHI* site (GGATCC [boxed]). Cloning with *BamHI* allowed the regeneration of a complete *BcgI* site (line 3). Excision through *BcgI* and religation yielded the desired sequence (line 4). It is critical that the sequences of segments C and D be at the proper distance from the restriction site and that segment D be preceded by the identical sequence found in the segment C overhang.

A, respectively), were joined sequentially in a similar fashion. The sequential addition of segments using the same type IIB restriction enzyme was possible because the full-type IIB restriction site was recreated

at their interface only after the joining of each segment. Thus, the system permitted reconstruction of the full-length PPV right-hand terminus containing both complex DNA (the 220-nt hairpin) and PCR-amplified strain-specific sequences regardless of the absence of naturally occurring restriction sites.

We also found it useful to introduce a multiple cloning site with a defined order of restriction sites in the vector to correlate with those in the segments. When using only one type of restriction enzyme, such as *BcgI*, the connection of segments C and D needs to be fully completed before segment B or A can be cloned and joined similarly. However, there are quite a few alternatives to *BcgI* (Table 1). Therefore, our system enables cloning of a series of segments in the desired order provided that each segment is separated from the next one with a different restriction enzyme. Sometimes a vector or an insert may already carry the recognition sequence of the type IIB restriction enzyme (Table 1). When no alternative enzymes can be used, a silent mutation can usually be introduced to inactivate the original site. Finally, an important advantage of having the different DNA segments to be studied in the same vector is that a set of clones in which all segments except one are connected can be generated. Each segment can then be easily swapped with alternative sequences for phenotypic studies.

The stability of the complex DNA in these clones was not self-evident. Terminal hairpins of parvoviruses are notorious

**Table 1**  
Useful type IIB restriction enzymes for seamless cloning

		pUC57	pBS	pS-Kan	pS-Amp
<i>AjuI</i>	(N) <sub>7</sub> 112GAA(N) <sub>7</sub> TTGG(N) <sub>11</sub> 16	0	0	1	0
<i>AlfI</i>	(N) <sub>10</sub> 112GCA(N) <sub>6</sub> TGC(N) <sub>12</sub> 10	1	0	1	0
<i>Alol</i>	(N) <sub>7</sub> 112GAAC(N) <sub>6</sub> TCC(N) <sub>12</sub> 7	0	1	0	0
<i>BaeI</i>	(N) <sub>10</sub> 115AC(N) <sub>4</sub> GTAYC(N) <sub>12</sub> 7	0	0	0	0
<i>Bari</i>	(N) <sub>7</sub> 112GAAG(N) <sub>6</sub> TAC(N) <sub>12</sub> 7	0	0	0	0
<i>BcgI</i>	(N) <sub>10</sub> 112CGA(N) <sub>6</sub> TGC(N) <sub>12</sub> 10	1	1	0	1
<i>BpI</i>	(N) <sub>8</sub> 113GAG(N) <sub>5</sub> CTC(N) <sub>13</sub> 8	0	0	0	0
<i>BsaXI</i>	(N) <sub>9</sub> 113AC(N) <sub>5</sub> CTCC(N) <sub>10</sub> 7	1	2	1	1
<i>CspCI</i>	(N) <sub>11</sub> 113CAA(N) <sub>5</sub> GTGG(N) <sub>12</sub> 10	0	0	0	0
<i>FalI</i>	(N) <sub>8</sub> 113AAG(N) <sub>5</sub> CTT(N) <sub>13</sub> 8	0	0	0	0
<i>Ppil</i>	(N) <sub>7</sub> 112GAAC(N) <sub>5</sub> CTC(N) <sub>13</sub> 8	2	3	0	1
<i>PsiI</i>	(N) <sub>7</sub> 112GAAC(N) <sub>6</sub> TAC(N) <sub>12</sub> 7	0	0	0	0
<i>TstI</i>	(N) <sub>8</sub> 113CAC(N) <sub>6</sub> TCC(N) <sub>12</sub> 7	0	0	0	0

*Note.* All enzymes produce 3' overhangs. Vectors: pUC57 (GenBank Y14837), pBS (pBluescript II KS(-), GenBank X52329), pS (pSmart-HC [high copy] with kanamycin, GenBank AF432107), and ampicillin (GenBank AF399742) resistance genes. The position of cleavage of *Alol* and *CspCI* may shift 1 nt depending on sequence (thereby requiring similar context). *AlfI* in pUC57 is in the multiple cloning site.

for their instability. For instance, the human parvovirus B19 was already cloned and sequenced, except for the termini, in 1986 [9]; however, it was only in 2004 that an infectious and stable clone was obtained [10]. We observed that using transcription terminators at both sides of the multiple cloning site (as in pSmart, Lucigen), lower copy number plasmids (e.g., pSmart-LC, Lucigen), recombination-deficient bacteria (e.g., Sure-II, Stratagene), and lower incubation temperatures (e.g., 30 °C) yielded clones with excellent stability. A large number (>15) of overnight cultures and subsequent sequencing and transfection showed the integrity of the genome and maintenance of their infectivity.

The method described here allows convenient seamless cloning of complex DNA, from either synthetic or PCR DNA fragments, by concatenation of individually, easily synthesized segments. It provides a system for rapid and very efficient exchange of segments, ranging from a few nucleotides to large fragments of complex DNA, for further phenotypic analysis.

### Acknowledgments

This work was supported by a grant to P.T. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. S.F. is grateful to the Fondation Armand-Frappier for a scholarship and will present these results as part of her Ph.D. thesis.

### References

- [1] G. Fang, B. Weiser, A. Visosky, T. Moran, H. Burger, PCR-mediated recombination: a general method applied to construct chimeric infectious molecular clones of plasma-derived HIV-1 RNA, *Nat. Med.* 5 (1999) 239–242.
- [2] A.S. Xiong, Q.H. Yao, R.H. Peng, X. Li, H.Q. Fan, Z.M. Cheng, Y. Li, A simple, rapid, high-fidelity, and cost-effective PCR-based two-step DNA synthesis method for long gene sequences, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e98.
- [3] N.A. Shevchuk, A.V. Bryksin, Y.A. Nusinovich, F.C. Cabello, M. Sutherland, S. Ladisch, Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) e19.
- [4] B.F. Binkowski, K.E. Richmond, J. Kaysen, M.R. Sussman, P.J. Belshaw, Correcting errors in synthetic DNA through consensus shuffling, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) e55.
- [5] J. Bergeron, J. Menezes, P. Tijssen, Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus, *Virology* 197 (1993) 86–98.
- [6] J. Bergeron, B. Hébert, P. Tijssen, Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: Identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates, *J. Virol.* 70 (1996) 2508–2515.
- [7] J.J. Marshall, D.M. Gowers, S.E. Halford, Restriction endonucleases that bridge and excise two recognition sites from DNA, *J. Mol. Biol.* 367 (2007) 419–431.
- [8] S. Jurenaite-Urbanaviciene, J. Serksnaite, E. Kriukiene, J. Giedriene, C. Venclovas, A. Lubys, Generation of DNA cleavage specificities of type II restriction endonucleases by reassortment of target recognition domains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (2007) 10358–10363.
- [9] R.O. Shade, M.C. Blundell, S.F. Cotmore, P. Tattersall, C.R. Astell, Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis, *J. Virol.* 58 (1986) 921–936.
- [10] N. Zhi, Z. Zádori, K.E. Brown, P. Tijssen, Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19, *Virology* 318 (2004) 142–152.

# **Annexe IV**

## Genetic Elements in the VP Region of Porcine Parvovirus Are Critical to Replication Efficiency in Cell Culture<sup>†</sup>

Sandra Fernandes, Maude Boisvert, and Peter Tijssen\*

INRS—Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531 boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7

Received 21 October 2010/Accepted 28 December 2010

**Factors controlling porcine parvovirus (PPV) replication efficiency are poorly characterized. Two prototype strains of PPV, NADL-2 and Kresse, differ greatly in pathogenic capacity both *in vivo* and *in vitro*, yet their genomic sequence is nearly identical (13 single-nucleotide substitutions and a 127-nucleotide noncoding repeated sequence). We have created a series of chimeras of these strains to identify the genetic elements involved in replication efficiency in the host porcine cell line. While the capsid proteins ultimately determine viral replication fitness, interaction between the NS1 protein and the VP gene occurs and involves interaction with the noncoding repeated sequence.**

Porcine parvovirus (PPV) is a nonenveloped icosahedral virus that causes reproductive failure in swine. Like its close relatives from the *Parvovirus* genus (*Parvovirinae*, *Parvoviridae* family), PPV has a linear, single-stranded 5-kb DNA genome of negative polarity, characterized by distinct hairpin termini (23). The large nonstructural (NS) protein NS1 is involved in genome replication (15, 18), transcription regulation (11, 19), and cytotoxicity (1, 16), while NS2 participates in capsid assembly (6) and nuclear export (9, 14). The structural proteins VP1 and VP2 assemble in a 1:10 ratio to form the 25-nm-diameter capsid (3, 12, 25). Little is known about the mechanisms that control parvovirus tropism. For PPV, permissivity is not determined at the cell surface (17, 20), since a high proportion of virus has been shown to enter cells by nonspecific pathways similar to that of macropinocytosis (4). The genomes of two PPV strains, NADL-2 and Kresse, differ by only 13 nucleotides (nt) and by a 127-nt repeated sequence near the right-end hairpin in the NADL-2 genome, yet they replicate with different efficiencies in both porcine and bovine cells (Fig. 1A) (2, 24). Some strains of the parvoviruses minute virus of mice (MVM), canine parvovirus (CPV), and H1 also have variable tandem repeats (65, 60, and 55 nt, respectively) (8). The benefits of these repeats for replication remain controversial (5, 21).

Interestingly, a sequencing analysis of PPV contaminants in pancrelipase extract pools suggested that the variability of North American isolates is very low compared to those of European, Brazilian, and Chinese isolates (Table 1) (13, 29, 30). While no substitutions from the Kresse strain were observed in the C-terminal portion of the VP proteins (nt 3869 to 4546) (2), nearly full-length sequences of the NS gene revealed that the contaminants contained substitutions from both strains (NADL-2, c537 and a1971; Kresse, a405, g1533, and c1668). A single nonsynonymous substitution in the NS1 region was observed to occur in two lots from 2009 (a875g or R195K; NS1

numbering). The significance of these changes is unknown at present.

To determine which genetic elements of NADL-2 and Kresse are involved in the difference in replication efficiency in the host porcine testis (PT) cell line, chimeras were constructed from the infectious clones (10). A seamless cloning system was used to swap segments in the right-hand terminus, including the hairpin, the 254-nt or 127-nt repeated sequence from the NADL-2 (Rn) or Kresse strain (Rk), respectively, and the terminal 524 nt of the VP gene (coding region 3 [CR3]) (Fig. 1A). Two other segments were swapped in the rest of the genome using classical methods. The first fragment, CR1, encompassed the entire NS gene and the 5' region of the VP gene. The second segment (CR2), corresponding to the central part of the VP region, contained two of the three nonsynonymous substitutions (D378G and H383Q from NADL-2 to Kresse; VP2 numbering) previously identified as part of the allotropic determinant for primary bovine testis cells (2). The third residue from this determinant (S436P), within CR3, was recently shown not to be involved in tropism (S. Fernandes, M. Boisvert, J. Szelei, and P. Tijssen, submitted for publication). In total, 14 different chimeras were constructed (Fig. 1B; the chimera naming scheme is X-YnRxy, with X being the backbone, Yn the inset from the other strain, and Rxy the repeat) and transfected in PT cells (28). Infection of fresh cells with the transfection supernatant produced small virus stocks that were titrated by immunofluorescence (IF) (4) and verified by sequencing of PCR fragments overlapping the entire genome. These stocks were used to infect PT cells at a multiplicity of infection (MOI) of 2 fluorescent focus-forming units (FFU) to compare replication efficiencies in single-round infection assays.

**VP gene elements and repeats influence replication efficiency.** Viral genome replication levels were monitored by quantitative PCR (qPCR) of cell lysates harvested at different times postinfection (p.i.) as described previously (4, 26). Results are expressed as the increase in the log of viral genome copy equivalents (GCE)/cell over initial GCE/cell at 8 h p.i. (Fig. 2A and B) (27). Early genome replication of Kresse was significantly lower than that of NADL-2 (Fig. 2A). Introducing CR2N into Kresse increased its early replication significantly or even to NADL-2 levels (K-N2, K-N2Rn, K-N23, K-N23Rn).

\* Corresponding author. Mailing address: INRS—Institut Armand-Frappier, Université du Québec, 531, boul. des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7. Phone: (450) 687-5010. Fax: (450) 686-5627. E-mail: peter.tijssen@iaf.inrs.ca.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 5 January 2011.

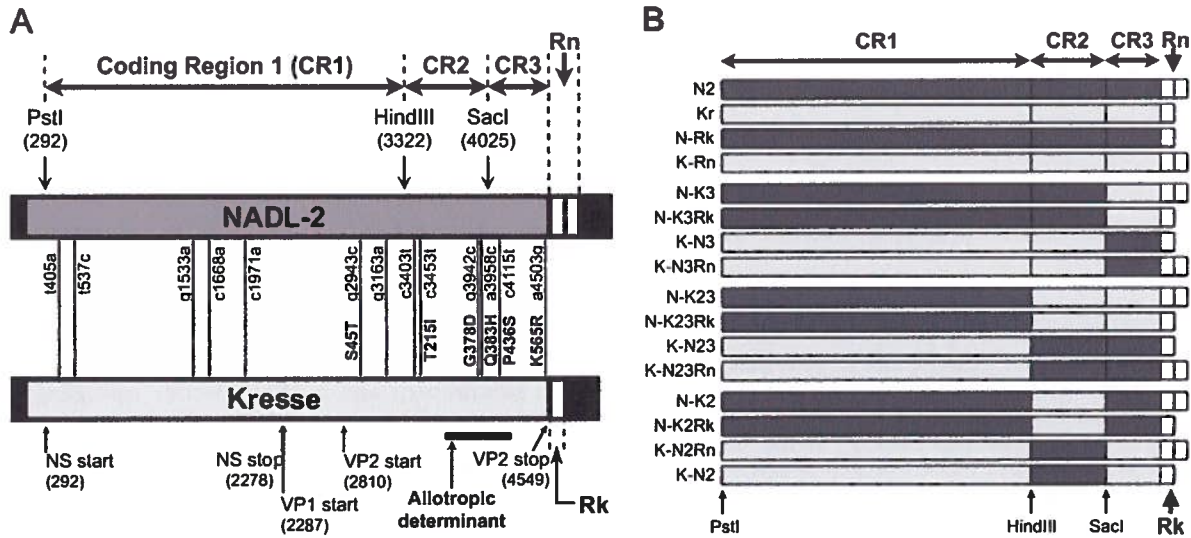


FIG. 1. Construction of chimeras from the NADL-2 and Kresse PPV strains. (A) The genomes of the two wild-type strains differ by 13 nt in their coding regions (CR1 to CR3) and by the repeated sequence downstream of the VP gene (white boxes). No differences are located within the hairpin termini (black boxes). The 127-nt (Rk) or the 254-nt (Rn) repeated sequence and the terminal 524 nt of the coding region (CR3) were amplified by PCR and swapped between backbones by seamless cloning (10). The CR1 and CR2 fragments were swapped in the infectious clones by classical methods. The CR1 fragment (PstI-HindIII, nt 290 to 3322) contained the entire NS coding region, including five synonymous mutations from NADL-2 to Kresse (a405g, c537t, a1533g, a1668c, a1971c) and the first of the nonsynonymous substitutions in the VP coding region (T45S in VP2 and L42V in SAT from NADL-2 to Kresse) (3, 28). The CR2 fragment (HindIII-SacI, nt 3322 to 4025) contained both silent mutations in the VP gene (nt g3163a, c3403t) and three of the nonsynonymous substitutions (VP2 I215T, D378G, H383Q from NADL-2 to Kresse). The C-terminal portion of the VP coding region contained the final two substitutions between the strains (VP2 residues S436P and R565K). Residues D378G and H383Q in CR2 and S436P in CR3 are in the BglII fragment that was previously identified as the allotropic determinant of the PPV strains in primary bovine testis cells (3). (B) A total of 14 chimeras were constructed by swapping CR1, CR2, CR3, and Rn or Rk between the NADL-2 (N2, dark gray) and Kresse (Kr, light gray) strains. The naming scheme is X-YnRxy, with X being the backbone, Yn the inset from the other strain, and Rxy the repeat.

However, the inverse construct (N-K2) did not decrease NADL-2 levels to that of Kresse unless the repeat was also swapped (N-K2Rk). N-K23 and N-K23Rk appeared normal in early replication but had a diminished level of replication from 10 to 20 h p.i. (Fig. 2B). Replication was usually further impaired by introducing CR3N into Kresse (K-N23 and K-N23Rn versus K-N2 and K-N2Rn; K-N3 versus Kresse) unless the NADL-2 repeat was introduced too (K-N3Rn versus K-N3). Swapping CR3N into Kresse replaces a lysine on the capsid surface with an arginine; this could affect ubiquitination, which was recently shown to be critical for PPV infection (4). At 20 h p.i., most differences in viral DNA replication were no longer apparent (Fig. 2B). Notable exceptions were the above-men-

tioned N-K23 and N-K23Rk as well as construct N-K3, which all showed surprisingly normal replication between 8 and 10 h p.i. In contrast, N-K3Rk displayed a replication level similar to that of other chimeras. These results suggested that repeat regions (R) interacted with elements in the VP gene or the capsid, both early and late in the infection.

**CR2 and CR3 from NADL-2 are required for optimal virus production.** Infectious virus production was monitored at different times p.i. by titration of supernatants on PT cells by IF (4). Release of virus was apparent by 16 h p.i. (data not shown) and continued to increase until 24 h p.i. (Fig. 2C), by which time cytopathic effects were apparent. As seen with late genome replication, combining CR2K or CR3K with Rn mark-

TABLE 1. Sequence analysis of PPV pools in pancrelipase extracts produced in North America between 2005 and 2009<sup>a</sup>

Strain	Nucleotide(s) at position:										
	403	405	537	875	1533	1668	1971	3942	3958	4115	4503
NADL-2	c	g	c	<i>a</i>	a	a	a	a	c	t	g
Kresse	c	a	t	<i>a</i>	g	c	c	g	a	c	a
PPVAx2005	ND	ND	c	ND	g	c	a	g	a	c	a
PPVAx2007	tc	ta	c	ND	g	c	a	g	a	c	a
PPVAx2009-1	tc	ta	c	<i>g</i>	g	c	a	g	a	c	a
PPVAx2009-2	tc	ta	c	<i>g</i>	g	c	a	g	a	c	a

<sup>a</sup> PPV genomes were amplified by overlapping PCR fragments and sequenced by standard methods. Some substitutions were not fully conserved (nt 403 and 405). Sequences covered the following nucleotides in the different samples: PPVAx2005, nt 1279 to 2345 and 3848 to 4679; PPVAx2007, nt 308 to 832, 1018 to 2343, and 3869 to 4675; PPVAx2009-1, nt 303 to 2343 and 3842 to 4677; PPVAx2009-2, nt 303 to 2369 and 3862 to 4546. Sequences were compared to those of NADL-2 (NCBI reference sequence accession no. NC\_001718.1) and Kresse (GenBank accession no. U44978.1) strains. Residues in bold are within the BglII fragment (allotropic determinant) identified for bovine cells (2). Residues in italics are different from those in both prototype strains. ND, not determined.

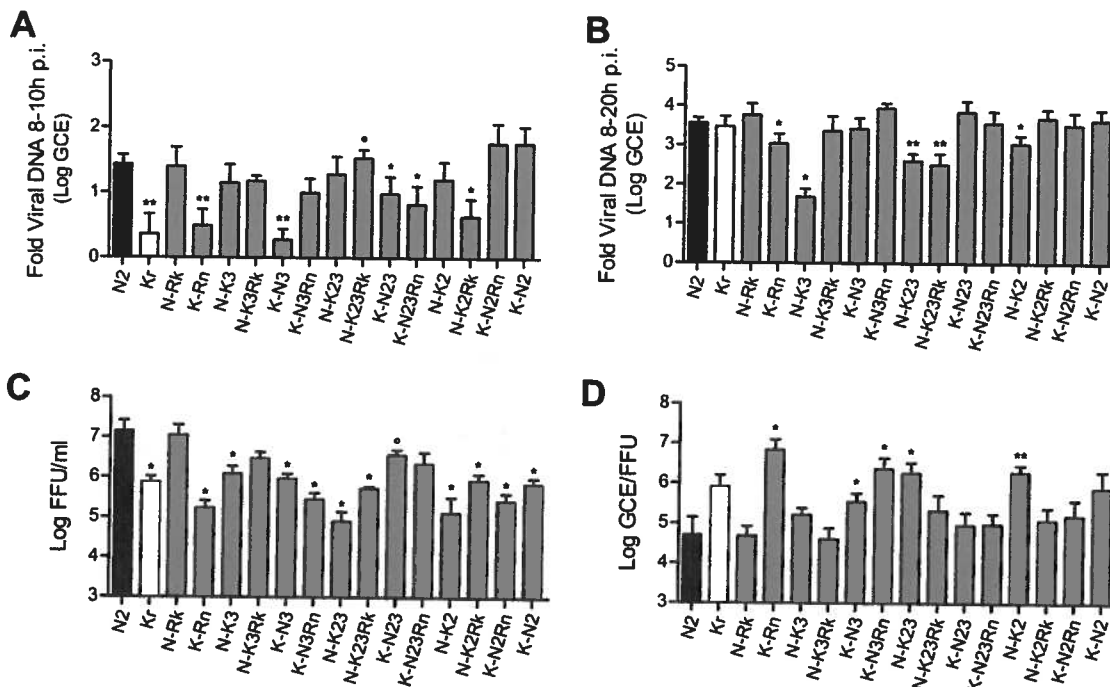


FIG. 2. Replication of the chimeras and wild-type strains in single-round infections assays. Early (A) and late (B) viral genome replication. Viral genome copy numbers were measured by qPCR and normalized to cell numbers using the *c-myc* gene to account for differences in efficiency in DNA extractions and between independent experiments (4, 26). Results are expressed as the increase in the log of genome copy equivalents (GCE) between 8 and 10 h p.i. (A) or between 8 and 20 h p.i. (B) (mean + standard deviation [SD] from at least three representative independent experiments). (C) Infectious virus production at 24 h p.i. Supernatant from cells infected with either chimera was titrated by immunofluorescence (IF) (4) and expressed as log FFU/ml (mean + standard error of the mean [SEM]) from at least three representative independent experiments. (D) Infectivity of the virus released at 20 h p.i. Supernatants from infected cells were titrated by IF, and viral genome copy numbers were determined by qPCR. Results are expressed as log GCE/FFU (mean + SD). Means were compared by unpaired two-tailed *t* test for NADL-2 (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ) and Kresse (°,  $P < 0.01$ ).

edly decreased infectious virus production. Furthermore, chimeras containing both CR2N and CR3N released more infectious virus regardless of Rn/Rk or CR1. No differences were observed in levels of VP protein accumulation at 16 h p.i. as assessed by Western blotting, suggesting that lower virus production was not due to reduced VP synthesis (data not shown). Capsid stability may be increased when CR2 and CR3 from the same strain are combined, since VP2 residues 378 and 383 from CR2 are positioned on adjoining sides of loop 3, while residue 565 from CR3 is positioned on the loop immediately adjacent to it, in close contact with the conserved residue L384 (22).

**CR2 from Kresse and Rn are incompatible for efficient packaging.** The infectivity ratio of the virus released from each chimera was determined by comparing the number of viral genome copies in the supernatant (by qPCR) to the infectious titers measured by IF. At 20 h p.i. (Fig. 2D), concurrent with the bulk release of virus, significant differences in the infectivity ratios were seen, most notably when CR2K and Rn were combined (K-Rn, K-N3Rn, N-K23, N-K2). Although VP residues 215, 378, and 383 are located on or near the capsid surface, we propose that the DNA sequence may also interact with the packaging machinery. Recent studies of MVM have shown that the NS1 protein binds with different affinities to moderately conserved consensus binding sites (TGGT) scattered across the genome and may serve to stabilize the DNA, much like chromatin (7). Interestingly, in the PPV coding

regions, there are 21 potential NS1 binding sites in the CR2 fragment, while only 56 more are found in the rest of the protein coding sequence (21 [TGTT] in 703 nt or 1 site every 33 nt in CR2 versus 56 in 3,554 nt or 1 in every 63 nt in CR1 and CR3 combined). Furthermore, the t3453c substitution (VP2 I215T from NADL-2 to Kresse) potentially creates an additional binding site within the Kresse genome. Since NS1 binding sites also occur in the repeated region (three in Rn and two in Rk), negative interactions may occur between the extra binding sites found by combining CR2K and Rn. This may slow the packaging process such that a higher percentage of genomes would be partially encapsidated, therefore increasing the ratio of GCE to FFU.

**CR2 and CR3 from NADL-2 ultimately determine viral fitness.** To identify the genomic fragment that most significantly contributed to replication efficiency, a fitness competition assay was designed. All possible pairs of chimeras were cotransfected in PT cells. After two subsequent passages, the dominant chimera in the supernatant was identified by comparing the sequence (Fig. 3A) and the size (Fig. 3B) of PCR fragments. Sorting the chimeras according to dominance indicated that the combination of CR2 and CR3 was the most important determinant of fitness in PT cells, while Rn was a secondary factor (Fig. 3C). When all else was equal, clones containing CR3N were dominant over those containing CR3K, suggesting that residues S436 and R565 are crucial to viral fitness. In the prevailing chimeras containing Rn, CR1 invariably came from

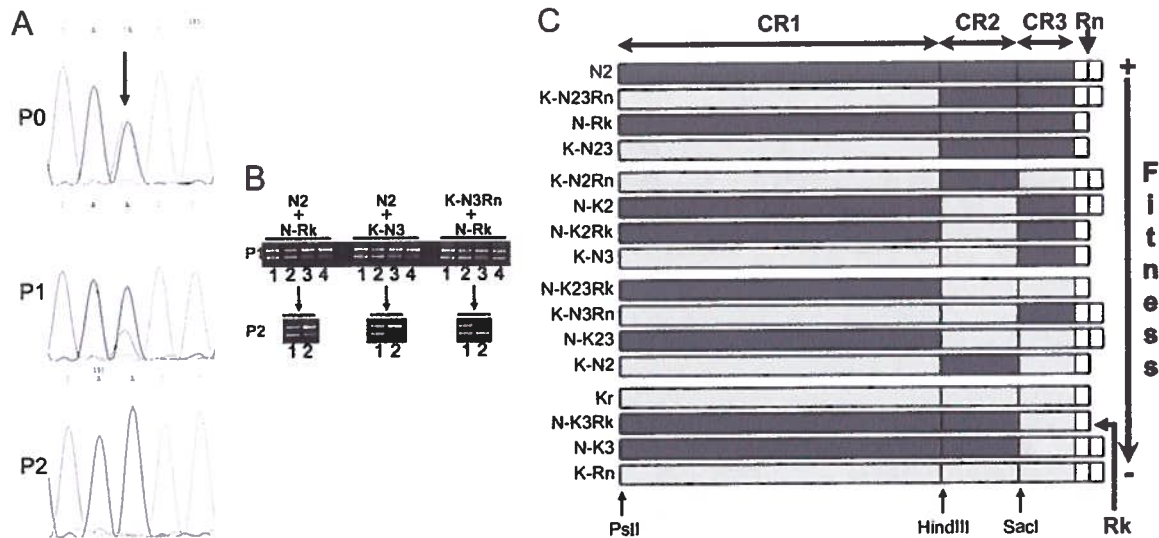


FIG. 3. Relative replication fitness of the chimeras. (A) The chimeras were cotransfected in pairs in PT cells, and the supernatants were used to reinfect cells for one or two viral passages. PCR of final supernatants (Sn) were analyzed by sequencing (A) to determine dominance. As an example, shown is the amplification of CR2 (c3958a) after cotransfection of chimeras N-K3 and N-K2Rk (P0, sequencing of input DNA for transfection; P1, sequencing of Sn from 1st viral passage; P2, sequencing of Sn from 2nd viral passage). (B) Dominance was also verified by comparing the amount of DNA in Sn at different times posttransfection (P1) and after the first viral passage (P2), in cotransfection with chimeras differing in the origin of Rn (top band) and Rk (bottom band). P1, PCR of Sn from cotransfections with N2 and N-Rk, N2 and K-N3, or K-N3Rn and N-Rk. Lane 1, PCR of input DNA; lane 2, PCR of Sn harvested at 24 h; lane 3, PCR of Sn harvested at 48 h; lane 4, PCR of Sn harvested at 72 h. P2, Sn harvested at 24 h from cotransfections was used to infect fresh cells. Lane 1, PCR of input virus (same as P1, lane 2); lane 2, PCR of Sn harvested at 48 h p.i. from 1st viral passage. Based on the results shown, N2 is dominant over N-Rk, N2 is dominant over K-N3, and N-Rk is dominant over K-N3Rn. (C) Relative replication fitness of each chimera was determined from dominance of each clone in cotransfection and reinfection experiments (120 combinations in total, two rounds of reinfection, in three independent experiments) determined as shown in panels A and B.

the same background as CR3, while CR1 matched CR2 when combined with Rk. These results suggest that the NS proteins may interact differently with the viral genome depending on the origin of the repeated sequence, possibly due to the low-affinity binding sites scattered throughout the genome. The fitness assay allowed an improved ranking of all the chimeras compared to the general information given in Fig. 2. As expected, the chimeras with the relatively fittest replication (Fig. 3C) demonstrated high levels of FFU in single-round production (Fig. 2C), whereas clones showing a high GCE-to-FFU ratio (Fig. 2D) displayed a lower level of fitness.

Comparison of NADL-2 and Kresse chimeras highlighted the multiple levels that influence replication efficiency. While the VP gene (regions CR2 and CR3) from the NADL-2 strain was the most important for viral fitness, both the proteins and the genome itself could be involved, since there was a low level of late genome replication in NADL-2 chimeras containing either CR2K or CR3K. Furthermore, the NADL-2 capsid may have slightly higher stability than Kresse, while packaging of NADL-2 was more efficient than in hybrid capsids. Finally, we have demonstrated that residues outside the bovine cell allotropic determinant are involved in the replication efficiency of Kresse and NADL-2 strains in porcine cells.

This research was funded in part by a grant from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada to P.T. and by scholarships from the Fondation Armand-Frappier to S.F. and M.B.

#### REFERENCES

- Anouja, F., R. Wattiez, S. Mousset, and P. Caillet-Fauquet. 1997. The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J. Virol.* 71:4671–4678.
- Bergeron, J., B. Hebert, and P. Tijssen. 1996. Genome organization of the Kresse strain of porcine parvovirus: identification of the allotropic determinant and comparison with those of NADL-2 and field isolates. *J. Virol.* 70:2508–2515.
- Bergeron, J., J. Menezes, and P. Tijssen. 1993. Genomic organization and mapping of transcription and translation products of the NADL-2 strain of porcine parvovirus. *Virology* 197:86–98.
- Boisvert, M., S. Fernandes, and P. Tijssen. 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J. Virol.* 84:7782–7792.
- Cossons, N., M. Zannis-Hadjopoulos, P. Tam, C. R. Astell, and E. A. Faust. 1996. The effect of regulatory sequence elements upon the initiation of DNA replication of the minute virus of mice. *Virology* 224:320–325.
- Cotmore, S. F., A. M. D'Abramo, Jr., L. F. Carbonell, J. Bratton, and P. Tattersall. 1997. The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* 231:267–280.
- Cotmore, S. F., R. L. Gottlieb, and P. Tattersall. 2007. Replication initiator protein NS1 of the parvovirus minute virus of mice binds to modular divergent sites distributed throughout duplex viral DNA. *J. Virol.* 81:13015–13027.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 2006. A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvoviruses, p. 171–188. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
- Eichwald, V., L. Daefler, M. Klein, J. Rommelaere, and N. Salome. 2002. The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J. Virol.* 76:10307–10319.
- Fernandes, S., and P. Tijssen. 2009. Seamless cloning and domain swapping of synthetic and complex DNA. *Anal. Biochem.* 385:171–173.
- Hanson, N. D., and S. L. Rhode III. 1991. Parvovirus NS1 stimulates P4 expression by interaction with the terminal repeats and through DNA amplification. *J. Virol.* 65:4325–4333.
- Jongeneel, C. V., R. Sahli, G. K. McMaster, and B. Hirt. 1986. A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J. Virol.* 59:564–573.
- Martins Soares, R., et al. 2003. Genetic variability of porcine parvovirus



- isolates revealed by analysis of partial sequences of the structural coding gene VP2. *J. Gen. Virol.* **84**:1505–1515.
14. **Miller, C. L., and D. J. Pintel.** 2002. Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J. Virol.* **76**:3257–3266.
  15. **Nuesch, J. P., S. Dettwiler, R. Corbau, and J. Rommelaere.** 1998. Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J. Virol.* **72**:9966–9977.
  16. **Nuesch, J. P., and J. Rommelaere.** 2006. NS1 interaction with CKII alpha: novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity. *J. Virol.* **80**:4729–4739.
  17. **Oraveerakul, K., C. S. Chol, and T. W. Molitor.** 1992. Restriction of porcine parvovirus replication in nonpermissive cells. *J. Virol.* **66**:715–722.
  18. **Rhode, S. L., III.** 1989. Both excision and replication of cloned autonomous parvovirus DNA require the NS1 (rep) protein. *J. Virol.* **63**:4249–4256.
  19. **Rhode, S. L., III, and S. M. Richard.** 1987. Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J. Virol.* **61**:2807–2815.
  20. **Ridpath, J. F., and W. L. Mengeling.** 1988. Uptake of porcine parvovirus into host and nonhost cells suggests host specificity is determined by intracellular factors. *Virus Res.* **10**:17–27.
  21. **Shangjin, C., M. Cortey, and J. Segales.** 2009. Phylogeny and evolution of the NS1 and VP1/VP2 gene sequences from porcine parvovirus. *Virus Res.* **140**:209–215.
  22. **Simpson, A. A., et al.** 2002. The structure of porcine parvovirus: comparison with related viruses. *J. Mol. Biol.* **315**:1189–1198.
  23. **Tattersall, P.** 2006. The evolution of parvovirus taxonomy, p. 5–14. *In* J. R. Kerr, S. F. Cotmore, M. E. Bloom, M. R. Linden, and C. R. Parrish (ed.), *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, United Kingdom.
  24. **Tijssen, P., J. Bergeron, R. Dubuc, and B. Hébert.** 1995. Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Semin. Virol.* **6**:319–328.
  25. **Tsao, J., et al.** 1991. The three-dimensional structure of canine parvovirus and its functional implications. *Science* **251**:1456–1464.
  26. **Wilhelm, S., P. Zimmermann, H. J. Selbitz, and U. Truyen.** 2006. Real-time PCR protocol for the detection of porcine parvovirus in field samples. *J. Virol. Methods* **134**:257–260.
  27. **Zadori, Z., et al.** 2001. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev. Cell* **1**:291–302.
  28. **Zadori, Z., J. Szelei, and P. Tijssen.** 2005. SAT: a late NS protein of porcine parvovirus. *J. Virol.* **79**:13129–13138.
  29. **Zhang, R., et al.** 2010. Phylogenetic analysis of the VP2 gene of canine parvoviruses circulating in China. *Virus Genes* **40**:397–402.
  30. **Zimmermann, P., M. Ritzmann, H. J. Selbitz, K. Heinritzi, and U. Truyen.** 2006. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J. Gen. Virol.* **87**:295–301.

