

*Université du Québec  
INRS-Institut Armand-Frappier*

*Étude de la protéine de structure VP1  
du parvovirus porcin (PPV)*

*Par  
Marie Eve Moreau*

*Mémoire  
présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M. Sc.) en Virologie & Immunologie*

*Jury d'évaluation*

*Dr. Jean-François Laliberté (président du jury), INRS-IAF  
Dr. Jean Bédard (examineur externe), Shire  
Dr. Peter Tijssen (directeur de recherche), INRS-IAF*

*Avril 2003*

## *RÉSUMÉ*

Le parvovirus porcin (PPV) comporte une capsid e icosaédrale non-enveloppée composée principalement de trois protéines de structure soit VP1, VP2 et VP3. Celles nommées VP1 sont constituées d'une extension amino-terminale unique dont une séquence en acides aminés hautement conservée parmi tous les parvovirus. Cette région aminée située au niveau de la partie unique de la VP1 possède un domaine enzymatique phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) vu la présence d'acides aminés dans cette région correspondant à ceux retrouvés au niveau du site catalytique de divers groupes de PLA<sub>2</sub> sécrétées. De ce fait, une activité phospholipase A<sub>2</sub> fut démontrée pour la partie unique de la VP1 (VP1 up) du parvovirus humain B19, du *Galleria mellonella* Densovirus (GmDENV) et du PPV en plus de l'importance de ce site catalytique pour l'infectivité virale. Cependant, aucune activité enzymatique n'est détectable pour les particules virales nouvellement formées suggérant que la région spécifique de la VP1 est séquestrée et réside à l'intérieur de la capsid e. Un stimulus externe doit donc induire l'exposition des domaines spécifiques aux VP1 à la surface de la capsid e virale afin que l'enzyme puisse jouer son rôle. Suivant cette idée, il fut possible de démontrer que la partie unique de la VP1 (VP1 up) n'est pas accessible à la surface de la capsid e du PPV et ce, à l'aide de séquences peptidiques présentées en surface de phages. Afin d'induire l'exposition de cette région unique à la surface du virion intacte, le PPV fut exposé à un choc thermique et ainsi, la VP1 fut détectée par ces phages spécifiques. Par immunodétection à l'or colloïdal, il a été possible de constater qu'une augmentation limitée de la température engendre des réarrangements conformationnels dans le virion permettant l'exposition irréversible de la VP1 up sans toutefois dissocier la capsid e virale. De plus, en immunofluorescence, en utilisant un sérum de lapin polyclonal reconnaissant la VP1 up, il s'avère que l'externalisation de la région unique de la VP1 lors d'une infection virale est réalisable suite à un choc thermique des cellules infectées laissant présager alors que l'existence d'un stimulus externe au niveau cellulaire est possible afin de permettre l'exposition de cette région. L'ensemble des données expérimentales issues de la présente étude appuie donc l'idée que le domaine spécifique à la VP1 soit rendu accessible dans le but d'exposer son motif PLA<sub>2</sub> et ainsi lui permettre d'exercer son activité enzymatique.



Marie Eve Moreau



Dr. Peter Tijssen, Directeur de recherche

# ***REMERCIEMENTS***

*J'aimerais dans un premier temps remercier mon directeur de recherche soit le professeur Peter Tijssen de m'avoir donné la chance de poursuivre mes études graduées au sein de son laboratoire. Son savoir scientifique ainsi que son expertise m'ont permis de découvrir les rudiments de la science et de la recherche.*

*J'aimerais exprimer ma gratitude au Dr. Zoltán Zádori avec qui j'ai collaboré tout au long de ma maîtrise. En me prenant sous son aile, il me fit découvrir «l'énergie biologique» sans laquelle il est impossible de réussir quoique ce soit! Au Dr. Yi Li ainsi qu'à Mohammed Elfar pour leur aide et leurs justicieux conseils.*

*Je me dois aussi de remercier Lise Forget au séquençage ainsi que Louise Nadon, Nicole Mayeu et Robert Alain pour leur précieuse aide en microscopie électronique.*

*Finalement, un gros merci à mes parents, bien sûr, pour leur soutien continu et leur amour inconditionnel, à Harold pour sa présence, son écoute et son aide et tout spécialement à Brad, pour sa patience, son aide, ses encouragements et sa pensée positive. Sans vous, plusieurs de mes projets n'auraient vu le jour.*



## *TABLE DES MATIÈRES*

<i>Résumé</i> .....	<i>ii</i>
<i>Remerciements</i> .....	<i>iv</i>
<i>Table des matières</i> .....	<i>vi</i>
<i>Liste des Figures</i> .....	<i>x</i>
<i>Liste des Tableaux</i> .....	<i>xi</i>
<i>Liste des Abréviations</i> .....	<i>xii</i>
<i>Introduction</i> .....	<i>1</i>
<i>Revue de littérature</i> .....	<i>5</i>
<b>1. Généralités parvovirales</b> .....	<b>6</b>
1.1. Classification et taxonomie .....	6
1.2. Propriétés biologiques .....	6
1.2.1. Caractéristiques de la particule virale .....	6
1.2.2. Culture <i>In Vitro</i> .....	7
1.2.3. Pathogénicité du genre <i>Parvovirus</i> .....	8
1.3. Propriétés physico-chimiques .....	9
1.4. Propriétés antigéniques .....	10
<b>2. Parvovirus Porcin (PPV)</b> .....	<b>10</b>
2.1. Souches virales et pathogénie .....	10
2.2. Nucléocapside .....	16
2.2.1. Structure secondaire .....	17
2.2.2. Morphologie de la capsidie .....	17
2.2.3. Propriétés de la capsidie .....	18
2.3. Génome du Parvovirus Porcin.....	21
2.3.1. Organisation génomique .....	22
2.3.2. Unités transcriptionnelles .....	22
2.3.3. Épissage alternatif .....	23
2.4. Protéines virales .....	27
2.4.1. Protéines non-structurales .....	27
2.4.2. Protéines structurales.....	28
<b>3. Cycle viral</b> .....	<b>32</b>
3.1. Événements précoces .....	33
3.1.1. Adsorption à la cellule hôte.....	33

3.1.2. Internalisation du virus et transport vers le noyau .....	34
3.1.3. Décapsidation et livraison de l'ADN viral.....	36
3.2. Réplication du génome.....	37
3.2.1. Réplication de l'ADN viral .....	37
3.2.2. Expression des protéines virales .....	38
3.3. Assemblage des capsides et sortie du virus.....	38
3.3.1. Transport des protéines structurales au noyau .....	38
3.3.2. Assemblage et encapsidation du génome.....	39
3.3.3. Relâchement des virions.....	40
<b>4. Protéine structurale VP1 .....</b>	<b>40</b>
4.1. Région unique de la protéine VP1 .....	41
4.1.1. Phospholipase A <sub>2</sub> et activité enzymatique .....	44
4.1.2. Localisation du peptide spécifique à VP1 .....	45
4.1.3. Implication du domaine unique à VP1 dans l'infection virale.....	49

## ***Méthodologie*** .....

<b>1. Généralités .....</b>	<b>52</b>
1.1. Gels de polyacrylamide.....	52
1.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	54
1.3. Gels d'agarose.....	54
1.4. Culture cellulaire.....	55
<b>2. Purification de virus.....</b>	<b>56</b>
2.1. Production virale .....	56
2.2. Récolte du virus.....	56
2.3. Purification sur coussin de sucre .....	57
<b>3. Expression de la partie unique de la protéine VP1 .....</b>	<b>58</b>
3.1. Système d'expression pBAD/TOPO thiofusion modifié .....	58
3.2. Clonage dans le vecteur pBAD modifié.....	58
3.3. Expression dans pBAD modifié.....	58
3.3.1. Induction avec l'arabinose .....	58
3.3.2. Sonication des protéines.....	59
3.4. Purification des protéines de fusion .....	59
3.4.1. Colonne de résine Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose (nickel) .....	59
3.4.2. Dialyse des protéines.....	63
3.5. Clivage avec la protéase rTEV.....	63
3.6. Purification sur colonne échangeuse d'ions .....	63
<b>4. Affichage de phages («Phage Display»).....</b>	<b>64</b>
4.1. Librairie peptidique .....	64
4.2. Sélection par affinité .....	65
4.2.1. Méthodologie de sélection .....	65
4.2.2. Enrichissement en phages spécifiques .....	66
4.2.3. Titrage des phages.....	66
4.3. Spécificité des phages sélectionnés.....	67

4.3.1. Production phagique.....	67
4.3.2. Mesure de la spécificité par ELISA .....	67
4.3.3. Extraction de l'ADN phagique.....	68
4.3.4. Séquençage.....	69
<b>5. Protéines phagiques.....</b>	<b>70</b>
5.1. Synthèse des oligonucléotides.....	70
5.2. Clonage dans le système pBAD/TOPO thiofusion modifié.....	70
5.2.1. Digestion et précipitation du plasmide pBAD modifié.....	70
5.2.2. Appariement des brins.....	73
5.2.3. Ligation dans pBAD modifié .....	73
5.2.4. Transformation par électroporation.....	73
5.2.4.1. Production de cellules compétentes .....	74
5.2.5. Sélection des clones positifs.....	75
5.2.5.1. Mini-préparation rapide d'ADN.....	75
5.2.5.2. Séquençage.....	76
5.3. Expression dans pBAD modifié .....	76
5.4. Purification des protéines induites .....	77
<b>6. Anticorps monoclonaux et polyclonaux .....</b>	<b>78</b>
6.1. Anticorps monoclonal 3C9.....	78
6.2. Sérum # 416 VP1 up .....	78
6.3. Sérum # 414 SAT .....	78
<b>7. Test ELISA.....</b>	<b>78</b>
7.1. Test ELISA avec les phages.....	79
7.2. Test ELISA avec les protéines phagiques .....	80
7.3. Test ELISA avec le sérum # 416 VP1 up.....	80
<b>8. Titre d'infectivité virale .....</b>	<b>81</b>
<b>9. Microscopie électronique.....</b>	<b>82</b>
9.1. Immunodétection à l'or colloïdal .....	82
<b>10. Susceptibilité de l'ADN viral du PPV à l'environnement externe.....</b>	<b>83</b>
<b>11. Immunofluorescence .....</b>	<b>84</b>
<b><i>Résultats</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>1. Accessibilité des épitopes spécifiques à la VP1 à la surface de la capsid.....</b>	<b>89</b>
1.1. Librairie phagique .....	89
1.1.1. Spécificité des phages isolés .....	89
1.1.2. Séquençage de l'ADN phagique .....	90
1.2. VP1 up détectée par les phages sélectionnés suite à un choc thermique .....	90
1.3. Protéines phagiques.....	95
1.3.1. Synthèse des oligonucléotides.....	95
1.3.2. Expression des protéines phagiques.....	95
1.3.2.1. Purification des protéines .....	95
1.4. Affinité des protéines de fusion envers la région unique de la VP1 .....	98



<b>2. Intégrité de la capsid e du PPV suite à un stimulus externe .....</b>	<b>101</b>
2.1. Exposition du domaine spécifique à la VP1 induite par choc thermique.....	101
2.1.1. Titre d'infectivité virale .....	101
2.2. Observation de l'intégrité des capsides suite à divers chocs thermiques.....	102
<b>3. Accessibilité de l'ADN viral à l'environnement externe.....</b>	<b>107</b>
<b>4. Étude de la VP1 up <i>In Vitro</i> .....</b>	<b>110</b>
4.1. Induction de l'externalisation de la VP1 up lors de l'infection virale .....	110
<b><i>Discussion</i> .....</b>	<b>118</b>
<b>1. Étude de l'accessibilité des épitopes spécifiques à la protéine VP1 .....</b>	<b>119</b>
1.1. Librairie phagique .....	119
1.2. Exposition de la VP1 up suite à un traitement des capsides à la chaleur.....	120
1.3. Protéines phagiques.....	121
1.3.1. Expression des protéines phagiques.....	121
1.4. Affinité des peptides synthétiques envers la région unique de la VP1 .....	121
<b>2. Caractérisation de l'intégrité de la capsid e du PPV .....</b>	<b>122</b>
2.1. Exposition du domaine spécifique à la VP1 et détection par un anti-VP1 up .	122
2.1.1. Titre d'infectivité virale .....	122
2.2. Observation de l'intégrité des capsides suite à divers chocs thermiques.....	123
<b>3. Accessibilité de l'ADN viral à l'environnement externe.....</b>	<b>124</b>
<b>4. Étude de la VP1 up <i>In Vitro</i> .....</b>	<b>125</b>
4.1. Induction de l'externalisation de la VP1 up lors de l'infection virale .....	125
<b><i>Conclusion</i> .....</b>	<b>127</b>
<b><i>Bibliographie</i> .....</b>	<b>129</b>

## ***LISTE DES FIGURES***

<i><b>Figure 1</b></i>	:	Structure de la capside parvovirale.....	19
<i><b>Figure 2</b></i>	:	Organisation génomique du parvovirus porcin.....	25
<i><b>Figure 3</b></i>	:	Protéines structurales VP1, VP2 et VP3.....	30
<i><b>Figure 4</b></i>	:	Séquences N-terminales de diverses VP1.....	42
<i><b>Figure 5</b></i>	:	Activité enzymatique de la PLA <sub>2</sub> .....	47
<i><b>Figure 6</b></i>	:	Système d'expression pBAD/TOPO thiofusion.....	61
<i><b>Figure 7</b></i>	:	Plateau de culture cellulaire.....	86
<i><b>Figure 8</b></i>	:	Mesure de la spécificité des phages.....	91
<i><b>Figure 9</b></i>	:	Test ELISA utilisant les phages sélectionnés.....	93
<i><b>Figure 10</b></i>	:	Profils électrophorétiques de la purification des protéines phagiques induites dans le système d'expression pBAD/TOPO thiofusion modifié.....	96
<i><b>Figure 11</b></i>	:	Détection de la VP1 up à l'aide des protéines phagiques.....	99
<i><b>Figure 12</b></i>	:	Test ELISA effectué avec le sérum polyclonal # 416 VP1 up et Titre d'infectivité virale.....	103
<i><b>Figure 13</b></i>	:	Immunomarquage indirect à l'or colloïdal.....	105
<i><b>Figure 14</b></i>	:	ADN viral du PPV.....	108
<i><b>Figure 15</b></i>	:	Observation en microscopie à fluorescence de cellules PT non-infectées et infectées avec le PPV pour une durée de 4 heures.....	112
<i><b>Figure 16</b></i>	:	Observation en microscopie à fluorescence de cellules PT non-infectées et infectées avec le PPV pour une durée de 8 heures.....	114
<i><b>Figure 17</b></i>	:	Observation en microscopie à fluorescence de cellules PT non-infectées et infectées avec le PPV pour une durée de 12 heures.....	116

## *LISTE DES TABLEAUX*

<i>Tableau I</i>	:	Souches virales du PPV.....	13
<i>Tableau II</i>	:	Oligonucléotides synthétisés.....	71
<i>Tableau III</i>	:	Séquences peptidiques des phages sélectionnés.....	91

## ***LISTE DES ABRÉVIATIONS***

<i>a.a.</i>	:	Acide aminé
<i>Å</i>	:	Armstrong
<i>AAV</i>	:	Virus associé à l'Adénovirus
<i>ADN</i>	:	Acide désoxyribonucléique
<i>ADV</i>	:	Aleutian Mink Disease Parvovirus (parvovirus vison)
<i>ARN</i>	:	Acide ribonucléique
<i>ARNm</i>	:	ARN messenger
<i>ATP</i>	:	Adénosine triphosphate
<i>bp</i>	:	Paire de bases
<i>BPV</i>	:	Parvovirus Bovin
<i>BSA</i>	:	Bovine Serum Albumine
<i>CAPS</i>	:	Acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique
<i>cm</i>	:	Centimètre
<i>cm<sup>3</sup></i>	:	Centimètre cube
<i>CO<sub>2</sub></i>	:	Monoxyde de carbone
<i>CPV</i>	:	Parvovirus Canin
<i>CsCl</i>	:	Chlorure de césium
<i>°C</i>	:	Degré Celsius

<b><i>D</i></b>	:	Donneur
<b><i>Da</i></b>	:	Dalton
<b><i>DMEM</i></b>	:	Dulbecco's Modified EagleMedium
<b><i>DO</i></b>	:	Densité optique
<b><i>DTT</i></b>	:	Dithiothreitol
<b><i>E.coli</i></b>	:	<i>Escherichia coli</i>
<b><i>EDTA</i></b>	:	Éthylènediaminetétraacétate
<b><i>ELISA</i></b>	:	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
<b><i>FITC</i></b>	:	Fluorescéine isothiocyanate
<b><i>FPV</i></b>	:	Parvovirus Félin
<b><i>GmDNV</i></b>	:	Galleria mellonella Densonucleosis Virus
<b><i>H-1</i></b>	:	Parvovirus Toolan du Rat
<b><i>HA</i></b>	:	Hémagglutination
<b><i>IF</i></b>	:	Immunofluorescence
<b><i>Ig</i></b>	:	Immunoglobuline
<b><i>kb</i></b>	:	Kilobase
<b><i>kDa</i></b>	:	Kilodalton
<b><i>kVolts</i></b>	:	Kilovolts
<b><i>LB</i></b>	:	Milieu de Luria-Bertani
<b><i>m</i></b>	:	Milli
<b><i>M</i></b>	:	Molaire

<b><i>MEV</i></b>	:	Virus de l'Entérite du Vison
<b><i>min</i></b>	:	Minutes
<b><i>ml</i></b>	:	Millilitre
<b><i>mm</i></b>	:	Millimètre
<b><i>mM</i></b>	:	Millimolaire
<b><i>MOI</i></b>	:	Multiplicité d'infection
<b><i>MVM</i></b>	:	Minute Virus of Mice
<b><i>N</i></b>	:	Normal
<b><i>nm</i></b>	:	Nanomètre
<b><i>NS</i></b>	:	Non-structurale (protéine ex.: NS1)
<b><i>ORF</i></b>	:	Cadre de lecture ouvert
<b><i>PBS</i></b>	:	Phosphate Buffer Saline
<b><i>PEG</i></b>	:	Polyéthylène-glycol
<b><i>PLA<sub>2</sub></i></b>	:	Phospholipase A <sub>2</sub>
<b><i>pvPLA<sub>2</sub></i></b>	:	Phospholipase A <sub>2</sub> putative virale
<b><i>sPLA<sub>2</sub></i></b>	:	Phospholipase A <sub>2</sub> sécrétée
<b><i>pmol</i></b>	:	Picomole
<b><i>PMSF</i></b>	:	Phenyl Methyl Sulfonyl Fluorid
<b><i>PNPP</i></b>	:	<i>p</i> -Nitrophényl Phosphate
<b><i>PPV</i></b>	:	Parvovirus Porcin
<b><i>psi</i></b>	:	Pression en livre par pouce carré

<b><i>PT</i></b>	:	Testicules de porc (lignée cellulaire)
<b><i>PTA</i></b>	:	Acide phosphotungstique
<b><i>rpm</i></b>	:	Rotation par minute
<b><i>RPV</i></b>	:	Parvovirus du Rat
<b><i>RV</i></b>	:	Parvovirus Kilham du Rat
<b><i>S</i></b>	:	Coefficient de sédimentation
<b><i>SDS</i></b>	:	Dodécylsulfate de sodium
<b><i>SK</i></b>	:	Testicules de porcelet
<b><i>sn</i></b>	:	Lien 2-acyl ester
<b><i>ST</i></b>	:	Testicules de porcelet (lignée cellulaire)
<b><i>TAE</i></b>	:	Tris Acétate EDTA
<b><i>TBST</i></b>	:	Tris NaCl Tween-20
<b><i>TE</i></b>	:	Tampon Tris-EDTA
<b><i>U</i></b>	:	Unité
<b><i>UFF</i></b>	:	Unité formant un foyer de fluorescence
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	:	Microgramme
<b><math>\mu\text{l}</math></b>	:	Microlitre
<b><i>up</i></b>	:	Partie unique
<b><i>UV</i></b>	:	Ultra-violets
<b><i>VP</i></b>	:	Protéine structurale (ex.: VP1)

# ***INTRODUCTION***



Vers les années soixante, il fut décrit un syndrome majeur relié à des problèmes de reproduction chez le porc. Par contre ce n'est qu'en 1975 que l'identification de l'agent causal eue lieu. Le parvovirus porcin (PPV) fut associé au syndrome **S.M.E.D.I.** où une infection par ce virus occasionne un regroupement de manifestations cliniques incluant la mort à la naissance (**Stillbirths**), la momification des fœtus (**Mummified fetuses**), la mort embryonnaire (**Embryonic Death**) ainsi que l'infertilité (**Infertility**). L'omniprésence de cet agent pathogène dans la majorité des cheptels porcins à travers le monde représente un fardeau économique considérable pour les éleveurs et l'industrie porcine. La vaccination demeure jusqu'à présent la seule alternative pour lutter contre le PPV mais la diversité croissante des souches compliquent la situation. De plus, le porc est devenu l'espèce animale suscitant le plus d'intérêt pour la xénotransplantation clinique. Les risques inhérents de cette alternative demeurent inconnus surtout au niveau viral où l'utilisation d'organes porcins pourrait fournir une occasion unique à certains virus de franchir la barrière d'espèce qui sépare le porc de l'homme.

Il importe alors d'accentuer les recherches sur les relations structures-fonctions du parvovirus porcin, entre autre, afin d'élucider les mécanismes et les déterminants régissant le tropisme de ce virus. Ainsi, l'élaboration appropriée de nouveaux vaccins et même d'agents anti-viraux pourrait voir le jour.

Le PPV fait partie de la famille *Parvoviridae* et du genre *Parvovirus* qui est constitué des virus à répllication autonome infectant les vertébrés. Ce petit virus non-enveloppé est constitué d'un génome viral codant pour trois protéines non-structurales, soit NS1, NS2 et NS3, en plus de deux protéines de structure, soit VP1 et VP2. Une troisième protéine structurale, VP3, est générée par une protéase cellulaire en éliminant un fragment à l'extrémité N-terminale de la VP2. Ces trois protéines virales formant la capsid possèdent une région C-terminale commune et ne diffèrent que par la longueur de leur extrémité N-terminale, faisant référence à la région unique de VP1 et VP2.

La partie unique de la VP1 (VP1 up) du PPV comporte une séquence en acides aminés hautement conservée parmi tous les membres des *Parvoviridae*. L'intérêt particulier porté récemment à cette région spécifique de la protéine de structure VP1 et ce, chez le PPV, a permis la découverte d'un domaine enzymatique puisque certains des acides aminés situés dans cette région correspondent à ceux retrouvés dans le site catalytique d'une enzyme soit la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). La présence d'une activité enzymatique PLA<sub>2</sub> virale au niveau de la région unique des VP1 du B19 (parvovirus humain), du GmDNV (parvovirus d'insectes) et du PPV fut démontrée tout comme l'importance de ce site catalytique pour l'infectivité virale. Cependant, chez le PPV, aucune activité PLA<sub>2</sub> n'est détectée au niveau des particules virales nouvellement formées supposant ainsi que la VP1 up n'est pas accessible à la surface des capsides.

Les stratégies employées par les parvovirus pour qu'ils traversent la membrane et le cytoplasme de la cellule hôte et qu'ils puissent libérer leur matériel génétique ainsi que les mécanismes moléculaires qui régissent la livraison nucléaire sont toujours incertains. Il faut pour mieux comprendre ces phénomènes utiliser la propriété qu'ont les capsides de plusieurs groupes de virus de changer légèrement de conformation lorsqu'elles sont exposées à une source externe d'énergie comme la chaleur. Ce changement pourrait refléter les modifications de la structure virale qui se produisent lors de l'infection et de l'entrée du virus dans la cellule. Ce stimulus externe pourrait alors induire l'exposition des domaines spécifiques aux VP1 à la surface du virion intact afin que l'enzyme puisse jouer son rôle. Cependant, le stimulus naturel responsable de ces réarrangements structuraux demeure jusqu'à maintenant inconnu.

La présente étude démontre donc que la région N-terminale propre à VP1 du PPV est séquestrée et réside à l'intérieur du virion demeurant ainsi inaccessible à la surface de la capside. Toutefois, lorsque le parvovirus porcine est exposé à un choc thermique, il est possible d'induire l'exposition de cette séquence spécifique à la surface de la particule intacte. En effet, une augmentation limitée de la température entraîne des réarrangements conformationnels dans le virion permettant ainsi l'exposition irréversible de la VP1 up.

Par contre, si les virus sont mis en présence de températures supérieures à 72°C, la structure est modifiée de façon importante c'est-à-dire qu'il y a dénaturation. Les données obtenues lors de ce projet permettent de croire que cette région spécifique à VP1 doit être externalisée suite à l'internalisation du virus dans la cellule permissive en plus d'être essentiel au virion afin de guider possiblement le génome vers les centres de réplication du noyau puisqu'il contient les puissantes séquences de localisation nucléaire.

L'importance d'une telle étude permettra éventuellement de déterminer comment et à quel moment lors de l'infection virale il y a externalisation de la région unique à VP1 à la surface de la capsid du PPV et ainsi il sera possible par la suite de mieux comprendre le rôle exact de la protéine de structure VP1 et de son activité PLA<sub>2</sub> lors d'une infection par ce virus.

# *REVUE DE LITTÉRATURE*

## **1. GÉNÉRALITÉS PARVOVIRALES**

### **1.1. Classification et taxonomie**

La classification de la famille *Parvoviridae* repose sur la morphologie et les caractéristiques fonctionnelles du virus. Centrée sur l'habilité à infecter les cellules de vertébrées ou d'invertébrées, cette famille est divisée en deux sous-familles soit *Parvovirinae* et *Densovirinae*, respectivement. Le sous-groupe *Parvovirinae* est composé de trois genres dont *Parvovirus*, *Erythrovirus* et *Dependovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Le genre *Parvovirus* comporte des virus à répllication autonome dont fait partie, entre autres, le Parvovirus Porcin (PPV), le MVM (Minute Virus of Mice) et le CPV (Canine Parvovirus). Le genre *Erythrovirus* est constitué aussi de virus à répllication autonome optant par contre pour une stratégie différente en ce qui a trait à la répllication et l'expression des protéines virales (Heegaard & Brown, 2002). Le parvovirus humain, soit le B19, est le virus représentatif de ce genre. Et finalement, le genre *Dependovirus* qui regroupe les virus nécessitant l'aide d'un virus auxiliaire pour une répllication efficace. Les AAV, soit les virus associés à un Adénovirus ou à un Herpèsvirus, font partis de ce genre. Pour ce qui est de la sous-famille *Densovirinae*, trois genres y sont aussi associés soit les genres *Densovirus*, *Iteravirus* et *Brevidensovirus* (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Cette sous-famille regroupe principalement les virus infectant les insectes.

### **1.2. Propriétés biologiques**

#### **1.2.1. Caractéristiques de la particule virale**

La particule virale des *Parvovirinae* est non-enveloppée et de petite taille d'environ 26 nm de diamètre (Van Regenmortel *et al.*, 2000). La capsidie présente une symétrie icosaédrale composée de soixantes copies de protéines structurales (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Cette structure diffère dépendemment si la capsidie contient de l'ADN ou si elle est vide (Arella *et al.*, 1990). Les protéines de structure composant la capsidie sont majoritairement au nombre de trois pour les virions matures tout dépendant

de l'espèce virale, soit VP1 ( $80-96 \times 10^3$  daltons), VP2 ( $64-85 \times 10^3$  daltons) et VP3 ( $60-75 \times 10^3$  daltons) chez le PPV, CPV, FPV et MVM (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Une quatrième protéine virale, VP4 ( $57.5 \times 10^3$  daltons), est présente par exemple chez le parvovirus bovin (BPV) (Mengeling *et al.*, 1988). Les virions immatures sont eux composés de seulement deux (CPV, FPV, PPV, MVM) ou trois (BPV) protéines structurales (Mengeling *et al.*, 1988). La variabilité des résidus en surface parmi les parvovirus est probablement l'information permettant de différencier leur propriété biologique comme l'interaction du virus avec le récepteur et les anticorps (Agbandje *et al.*, 1995).

La capside recouvre le génome viral qui est une molécule d'ADN simple brin et linéaire d'une grandeur variant entre 4 et 6 kb selon l'espèce virale (Van Regenmortel *et al.*, 2000). L'ADN représente de 19 à 32% de la masse totale des virions, les protéines de la capside forment la masse restante (Siegl *et al.*, 1985). La majorité des virus constituant le genre *Parvovirus* n'encapside que le brin négatif d'ADN. Tandis que l'encapsidation de 50% de brins positifs et de 50% de brins négatifs peut être observée chez les genres *Erythrovirus* et *Dependovirus* (Tijssen, 1990).

### **1.2.2. Culture *In Vitro***

La culture cellulaire s'effectue chez la majorité des parvovirus autonomes à l'aide de cellules homologues ou étroitement liées à l'hôte ciblé (Siegl *et al.*, 1985). Les lignées primaires ou permanentes propres à un virus sont susceptibles à l'infection et vont permettre la réplication virale (Siegl, 1984). En ce qui a trait au parvovirus porcine par exemple, ce virus est habituellement cultivé sur des lignées cellulaires permanentes provenant de tissus de porc telles que les cellules PT (testicules de porc) et les cellules SK (testicules de porcelet) (Bergeron *et al.*, 1996).

### 1.2.3. Pathogénicité du genre *Parvovirus*

Les membres du genre *Parvovirus* requiert une ou plusieurs fonctions cellulaires générées durant la phase S (phase S tardive) du cycle de division cellulaire afin de promouvoir leur réplication (Siegl *et al.*, 1985). En effet, les parvovirus autonomes démontre un fort tropisme envers les cellules en division vu leur besoin de facteurs cellulaires exprimés durant la phase S du cycle cellulaire d'où une prédilection pour les jeunes animaux et ceux à naître ou pour les tissus d'animaux adultes comportant des cellules en prolifération (Doerig *et al.*, 1990; Tijssen *et al.*, 1999). Plusieurs de ces virus sont extrêmement spécifiques à un tissu donné et sont capables de croître seulement au niveau de cellules étant dans une période particulière de différenciation (Doerig *et al.*, 1990). Dû à leur capacité codante limitée et leur inhabilité à induire une réplication cellulaire, une préférence est remarquée chez les parvovirus tels que le PPV, CPV et FPV pour l'infection de populations cellulaires ayant une activité mitotique élevée puisque la division cellulaire est une condition essentielle à la réplication virale (Tijssen *et al.*, 1999). En fait, la réplication des parvovirus dépend des fonctions cellulaires transitoirement exprimées durant la phase mitotique S tardive et G précoce du cycle cellulaire (Tijssen *et al.*, 1999). Même si la majorité des tissus adultes sont mitotiquement peu actifs, l'épithélium intestinal ainsi que le système hématopoïétique comportent une grande proportion de cellules en division (Cotmore & Tattersall, 1987). Ils deviennent ainsi la cible de certains parvovirus causant l'apparition de maladies fatales chez l'animal adulte (Cotmore & Tattersall, 1987).

De nombreuses études passées sur la pathogénicité des parvovirus autonomes ont démontré qu'ils sont principalement des agents tératogènes (Cotmore & Tattersall, 1987). En général, ils engendrent des anomalies fœtaux et néonataux en détruisant des populations cellulaires spécifiques qui sont en prolifération rapide durant le cours normal de développement (Cotmore & Tattersall, 1987). Cette dépendance absolue pour la phase S expliquerait une plus grande résistance des animaux adultes face à l'infection virale, contrairement aux fœtus et aux nouveaux-nés (Cotmore & Tattersall, 1987). Des facteurs comme la voie d'infection, la souche virale et la dose, l'espèce animale et le moment de l'infection durant la grossesse influencent aussi l'apparition de la maladie (Cotmore &

Tattersall, 1987). Les infections causées par plusieurs parvovirus de souris (MVM, MPV, RPV) sont habituellement asymptomatiques chez l'adulte de même que chez les jeunes. Mais elles peuvent perturber les fonctions immunitaires (MVMi, MPV-1a), être sévères ou létales (RV, H-1 virus) et même entraîner des anomalies au niveau du développement mental (Jacoby *et al.*, 1996). Chez le porc, les infections parvovirales engendrent principalement des problèmes liés à la reproduction (Tijssen *et al.*, 1999).

### 1.3. Propriétés physico-chimiques

La masse moléculaire relative des virions constituant la sous-famille *Parvovirinae* est environ de  $5.5-6.2 \times 10^6$  daltons et la masse moléculaire des capsides vides a été estimée à  $4.2 \times 10^6$  daltons (Van Regenmortel *et al.*, 2000). Fréquemment, les parvovirus vont démontrer trois types de particules lorsque centrifugés sur un gradient de chlorure de césium (CsCl) (Siegl *et al.*, 1985). Les particules vides, sans ADN détectable, sont trouvées à une densité d'environ  $1.31 \text{ g/cm}^3$  tandis que les particules infectieuses sont trouvées à deux différentes densités (Siegl *et al.*, 1985). Une bande se situant entre  $1.44-1.48 \text{ g/cm}^3$  représente les particules dites lourdes et une autre bande à  $1.38-1.45 \text{ g/cm}^3$  comporte les particules dites légères (Clinton & Hayashi, 1975). Le coefficient de sédimentation pour un virion mature est de 110S tandis que les capsides vides vont sédimenter à 70S sur un gradient de vélocité (Cotmore & Tattersall, 1987). Bien que la proportion de particules pleines et vides peut varier dépendamment du type cellulaire et du virus, les virions vides surpassent en nombre habituellement les particules infectieuses de 2 à 50 fois (Cotmore & Tattersall, 1987).

Classiquement, les parvovirus sont considérés comme des particules hautement stables. Elles sont résistantes à l'extraction par des solvants lipidiques, à des pH se situant entre 3 et 9, en plus d'être relativement stables à de hautes températures pouvant aller jusqu'à  $70^\circ\text{C}$  (Cotmore & Tattersall, 1987; Cotmore *et al.*, 1999). Une résistance aux solvants organiques, tels que le butanol et le chloroforme, à certaines enzymes soit la DNase, la RNase et à une variété de protéases fut notée (Tijssen *et al.*, 1999). Les capsides peuvent aussi résister à plusieurs détergents, bien qu'elles sont dissociées dans



des solutions de dodécylsulfate de sodium (SDS), sensibles aux irradiations UV et inactivées par certains produits comme le formalin et les agents oxydants (Tijssen *et al.*, 1999; Siegl *et al.*, 1985). Les propriétés physico-chimiques des parvovirus permettent beaucoup de flexibilité quant au choix de la méthode de purification du virus.

#### **1.4. Propriétés antigéniques**

Les parvovirus furent identifiés et différenciés entre eux par la spécificité des déterminants antigéniques exposés à la surface de leur capsid intacte (Cotmore & Tattersall, 1987). La plupart de ces virus sont connus pour agglutiner les érythrocytes provenant de diverses espèces (ex.: cobayes, humains, cochons) et les sérotypes sont caractérisés par les différents patrons d'hémagglutination (Cotmore & Tattersall, 1987). Il est connu que la cause de l'hémagglutination est l'adhésion des capsides virales à la surface des globules rouges où la liaison nécessite souvent l'intermédiaire d'un acide syalique (Barbis *et al.*, 1992). Cette propriété peut s'avérer très utile en laboratoire : en déterminant le titre d'hémagglutination (HA), il est possible de doser les capsides en conditions standardisées (Barbis *et al.*, 1992). De plus, il est possible d'identifier les souches parvovirales à l'aide d'un test d'inhibition d'hémagglutination utilisant des anticorps ou des antisérums engendrant l'inhibition (HAI) (Cotmore & Tattersall, 1987). Toutefois, la caractérisation de la structure hémagglutinante et la signification biologique de l'hémagglutination parvovirale (HA) est présentement inconnue (Barbis *et al.*, 1992).

## **2. PARVOVIRUS PORCIN (PPV)**

### **2.1. Souches virales et pathogénie**

Le parvovirus porcine est l'agent causal majeur du syndrome occasionnant des problèmes de reproduction chez le porc, lesquels incluent la mort à la naissance (Stillbirth), la momification des fœtus (Mummification), la mort embryonnaire (Embryonic Death) et l'infertilité (Infertility), d'où le nom du syndrome SMEDI (Dunne *et al.*, 1965; Tijssen *et*

*al.*, 1995). Les parvovirus porcins furent isolés à partir d'une variété de sources incluant les tissus porcins, les fœtus momifiés, les lésions de la peau et comme contaminant dans des cultures cellulaires (Tijssen *et al.*, 1995).

Le PPV est un parvovirus à réplication autonome classifié dans le genre *Parvovirus* avec des propriétés physico-chimiques et des séquences génomiques qui ressemblent à celles du MVM et du parvovirus rongeur H-1, du MEV (Mink Enteritis Virus), du parvovirus canin (CPV) et du FPV (Feline Panleukopenia Virus) (Tijssen *et al.*, 1995). La caractérisation moléculaire de certaines souches du PPV a révélé une identité de séquence presque parfaite parmi les génomes des brins virulents et avirulents (Tijssen *et al.*, 1995). Malgré cette ressemblance génomique, les souches du PPV peuvent être distinguées à l'intérieur d'au moins quatre groupes en respectant la pathogénicité: non- pathogènes (KBSH, NADL-2), pathogènes aux fœtus non-immunocompétents menant à la mort (NADL-8, IAF-76), pathogènes aux fœtus immunocompétents en plus de causer des dermatites, souches hautement pathogènes (Kresse, IAF-A54) et finalement, le quatrième groupe est constitué de la souche IAF-A83 causant des problèmes entériques (*Tableau I*) (Tijssen *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 1996).

La souche non-pathogène NADL-2, laquelle est couramment utilisée comme vaccin, cause seulement une virémie limitée et dans les infections expérimentales ne traverse pas la barrière placentaire (Bergeron *et al.*, 1996). Au contraire, les souches virulentes isolées de fœtus momifiés comme NADL-8 et IAF-76 causent une virémie et traversent le placenta résultant en une infection fatale des fœtus non-immunocompétents (Bergeron *et al.*, 1996). Une virémie semble donc probablement un prérequis pour une infection transplacentaire (Mengeling & Cutlip, 1976). Bien que NADL-2 soit inoffensive lorsque administrée oralement, elle est responsable de la mort fœtale quand elle est injectée directement dans l'utérus à l'intérieur des fluides extra-fœtaux (Bergeron *et al.*, 1996). Une différence dans la virulence des souches NADL-8 et NADL-2 est l'absence de maladie reproductive parmi les jeunes truies exposées à la souche NADL-2 seulement (Mengeling & Cutlip, 1976). Il a été suggéré que l'avirulence de NADL-2 pourrait être due à la génération d'une proportion élevée de génomes variés défectueux qui ralentiraient la réplication du virus après l'infection d'un animal susceptible

(Bergeron *et al.*, 1993). Depuis que la souche NADL-2 induit une virémie maternelle et est létale pour les fœtus porcins quand elle est injectée directement à l'intérieur du fluide allantoïque, la différence semble apparemment provenir d'un défaut de cette souche à traverser le placenta (Mengeling & Cutlip, 1976). C'est par cette absence d'infection au placenta que la souche NADL-2 est devenue le candidat utilisé en vaccination (Mengeling & Cutlip, 1976).

La souche NADL-2 diffère de seulement quelques résidus de la capsid e d'avec les souches pathogènes du PPV (Simpson *et al.*, 2002). Le changement des résidus en position 378, 383 et 436 est suffisant pour altérer le phénotype entre NADL-2 et Kresse par exemple, bien qu'il n'est pas connu si tous les trois sites sont essentiels (Simpson *et al.*, 2002). Le séquençage de la souche Kresse a par contre révélé que des différences codantes mineures localisées à l'intérieur de la région codante de VP1/VP2 sont responsables de la différence de tropisme observée *in vitro* entre ces souches (Bergeron *et al.*, 1996).

Les souches Kresse et IAF-A54 causent des dermatites. Ces souches dermatiques démontrent une virulence plus accrue que les autres souches dites virulentes, entraînant la mort des fœtus immunocompétents (Bergeron *et al.*, 1996). Plusieurs isolats de PPV, incluant NADL-8 et IAF-76, ont été obtenus à partir de divers tissus fœtaux infectés, tandis que d'autres comme Kresse et IAF-A54, furent isolés de cellules épidermales, suggérant ainsi que les différences de pathogénicité sont dues aux tropismes tissulaires distincts de ces souches (Simpson *et al.*, 2002). Il faut donc considérer une possible infection au PPV dans le cas de différents diagnostics de maladies vésiculaires porcines puisque la souche Kresse fut associée à des lésions nécrotiques observées chez le porc (Kresse *et al.*, 1985).

**Tableau 1: Souches virales du PPV**  
*Les différentes souches du parvovirus porcin classifiées en divers groupes selon la pathogénicité.*

Groupe	Souche(s)	Origine	Pathologie
#1	NADL-2 / KBSH	leuco. / cell. KB	non-pathogènes
#2a	NADL-8 / IAF-76	fœtus / thyroïde	pathogènes aux fœtus non-immunocompétents
#2b	Kresse / IAF-A54	peau (dermatite)	dermatite & pathogènes aux fœtus immunocompétents
#3	IAF-A83	intestinale	diarrhée

*(Tijssen & al., 1995)*

Des différences dramatiques dans les propriétés pathogéniques entre ces isolats ont été notées dans les fœtus au dernier terme de la gestation (Choi *et al.*, 1987). En effet, l'isolat Kresse est hautement pathogène pour les fœtus au dernier terme de la gestation tandis que l'isolat NADL-8 ne l'est pas (Choi *et al.*, 1987). La virulence accrue de la souche dermatite Kresse envers les fœtus peut suggérer un haut niveau de réplication : la réponse immunitaire de l'hôte devient donc insuffisante pour éliminer le virus (Kresse *et al.*, 1985; Choi *et al.*, 1987; Tijssen *et al.*, 1995). En plus, la présence de dépôts de complexes immuns dans les tissus des fœtus inoculés par le virus Kresse pourrait indiquer que les lésions observées sont le résultat d'une maladie immune (Tijssen *et al.*, 1995). Ce type de pathologie est bien décrit dans une infection chez le vison par le ADV (Aleutian Disease Virus) et clairement suspecté chez les humains infectés avec le parvovirus B19 où, après la phase de réplication du virus, une maladie soudaine a lieu au moment où une réponse immunitaire est détectable (Tijssen *et al.*, 1995).

L'infection ou la mort des fœtus après que l'immunocompétence soit atteinte, c'est-à-dire près de 70 jours pour l'infection ou l'immunocompétence, est seulement observée chez les isolats hautement pathogéniques comme Kresse et IAF-A54 qui sont habituellement associés à des lésions nécrotiques de la peau chez la mère (Tijssen *et al.*, 1999). Des différences dans la pathogénèse du PPV furent aussi démontrées lorsque des jeunes truies enceintes furent infectées par voie orale et intramusculaire (Joo *et al.*, 1976). Par la voie orale, le PPV prend 23 à 32 jours pour traverser le placenta suivant une infection de la mère comparativement à 15 jours pour la voie intramusculaire (Joo *et al.*, 1976). De plus, une infection fœtale résulte en une mort et une momification seulement si l'infection des fœtus a lieu avant l'établissement d'une immunité compétente estimée à 70 jours de gestation (Joo *et al.*, 1976).

Le temps de gestation, estimé à 120 jours, où les jeunes truies sont exposées au virus est un important facteur dans la détermination de l'éventuel sort de leur fœtus (Mengeling & Cutlip, 1976). En effet, les fœtus infectés dans les 40 premiers jours de la gestation peuvent mourir avant que le système immunitaire se développe, soit mourir même après une réponse en anticorps retardataires, ou survivre jusqu'à la mise à bas (Joo *et al.*, 1976). Les fœtus infectés 50 jours environ après la gestation survivent et naissent

avec le virus et les anticorps (Joo *et al.*, 1976). Des études antérieures avaient démontré que les fœtus porcins sont immunocompétents durant le dernier tiers de la gestation et peuvent survivre à une infection au PPV sans aucun effet clinique, bien qu'une infection au PPV durant cette période peut engendrer la mort à la naissance, la mort néonatale et une réduction de la viabilité néonatale (Choi *et al.*, 1987).

Les infections au PPV sont souvent inoffensives pour les animaux adultes excepté pour quelques souches de PPV associées à de sévères dermatites ou entérites (Tijssen *et al.*, 1999). Les souches non-virémiques sont aussi considérées inoffensives à moins d'inoculer *in utero* avant l'immunocompétence où elles causeront des avortements (Tijssen *et al.*, 1999). La souche virale aussi bien que la dose ou la voie utilisée pour l'infection pourraient ensemble expliquer les variations dans la pathogénicité (Tijssen *et al.*, 1995). La différence dans le tropisme et la pathogénicité entre ces souches semble, toutefois, être localisée sur la capsid virale (Tijssen *et al.*, 1995).

## 2.2. Nucléocapside

Les capsides pleines des parvovirus autonomes comportent une soixantaine de copies d'une combinaison de protéines structurales VP1, VP2, et VP3. Elles forment un icosaèdre d'une symétrie T=1 selon la nomenclature de Caspar et Klug. Chacune des sous-unités possède un motif structural commun avec d'autres virus à ADN ou ARN qui est fait d'un baril- $\beta$  anti-parallèle à huit brins (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995; Xie & Chapman, 1996). Les protéines VP1, VP2 et VP3 se chevauchent en séquence et sont identiques excepté pour leur extrémité N-terminale (Xie & Chapman, 1996; Agbandje *et al.*, 1995). De plus, la capsid contient seulement quelques sous-unités de VP1 tandis que les sous-unités VP2 composent la majeure partie de la capsid (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Les capsides vides peuvent être assemblées avec VP2 seulement (Agbandje *et al.*, 1995). Les structures tri-dimensionnelles des particules pleines et vides du CPV et de son proche homologue soit le FPV ont été résolues à 3.5 Å en utilisant la cristallographie à rayons-X ainsi que tout récemment, celles du PPV à 5.5 Å, par Simpson et ses collaborateurs en 2002 (Agbandje *et al.*, 1994 et 1995).

### 2.2.1. Structure secondaire

La capsidie icosaédrale T=1 est composée de 60 copies de protomères (principalement VP2/VP3), chacun se repliant suivant une structure en baril- $\beta$  anti-parallèle de huit brins (Tijssen *et al.*, 1995). Ces sous-unités de la capsidie sont organisées selon un repliement de feuillets bêta qui est retrouvé dans la majorité des autres structures virales bien que ceux-ci ne soient pas homologues (Chapman & Rossmann, 1993; Agbandje *et al.*, 1994; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Les régions unissant les feuillets bêta dans cette structure en baril forment des boucles qui prédominent à la surface de la capsidie. Le motif baril- $\beta$  constitue la majeure partie de la coquille de la capsidie mais ne compte que pour seulement environ le tiers des acides aminés contenus dans chacun des polypeptides (Agbandje *et al.*, 1995). Chapman et Rossmann en 1993 ont démontré que la séquence en acides aminés dans la structure centrale du baril- $\beta$  des parvovirus a une forte conservation comparativement à ceux des insertions en surface. En effet, les séquences à la surface des boucles exposées sont moins conservées que les régions internes de la capsidie (Simpson *et al.*, 2002). Les boucles sont responsables de la distinction de chaque parvovirus et le degré d'homologie voire même d'identité est très élevé au niveau des feuillets alors que les boucles sont très variables. La surface exposée des boucles est donc composée des résidus étant le plus souvent associés au tropisme, au spectre d'hôte et à l'hémagglutination. En fait, ces boucles sont impliquées dans plusieurs fonctions biologiques importantes (Tijssen *et al.*, 1995).

### 2.2.2. Morphologie de la capsidie

Le repliement des protéines structurales et l'assemblage des différentes sous-unités dans une forme icosaédrale résultent en une topologie irrégulière mais géométrique par la présence de protubérances et de dépressions. Il est possible de décrire la morphologie de la capsidie virale en fonction des axes de symétrie d'ordre 2, 3 et 5. La capsidie comporte certains éléments topologiques tels que protubérance à l'axe de symétrie d'ordre 3, légère dépression à l'axe de symétrie d'ordre 2 et pore cylindrique



entouré d'une dépression appelé canyon à l'axe de symétrie d'ordre 5 (*Figure 1*). La topographie de surface révèle une éminence de 22 Å de hauteur par 70 Å de largeur dénommée spicule dominant les axes de symétrie d'ordre 3. Une structure cylindrique chapeautant les axes de symétrie d'ordre 5 entourée d'une dépression circulaire, soit un canyon de 15 Å, est observée (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995). Les brins anti-parallèles à l'intérieur d'un seul polypeptide sont liés entre eux par des liens hydrogènes alors que cinq feuillettes sont seulement lâchement associés autour de chacun des axes de symétrie d'ordre 5 (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995). Finalement, une dépression de 15 Å s'étendant le long des axes de symétrie d'ordre 2 est aussi visible (Tsao *et al.*, 1991; Agbandje *et al.*, 1995).

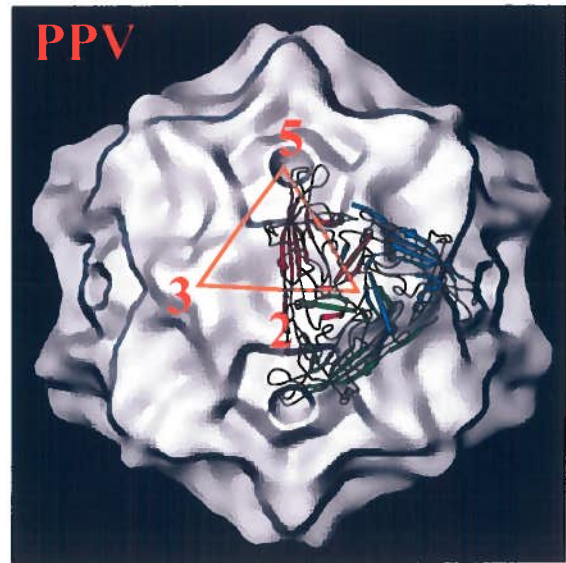
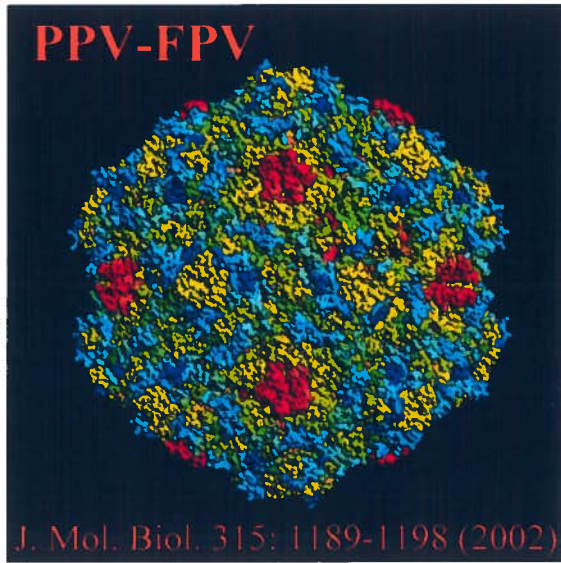
### 2.2.3. Propriétés de la capside

Plusieurs fonctions biochimiques et d'autres propriétés peuvent être attribuées aux résidus exposés à la surface des capsides des parvovirus (Tijssen *et al.*, 1995). En effet, les résidus déterminant les hôtes potentiels sont regroupés à la surface de la capside, localisés soit sur l'accotement de la pointe de l'axe de symétrie d'ordre 3 ou sur le pourtour de la dépression en forme de fossette de l'axe de symétrie d'ordre 2 (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Cette fossette fut d'ailleurs postulée comme un site possible d'interaction avec les facteurs cellulaires qui définissent les hôtes susceptibles et le tropisme tissulaire (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Ainsi, la capside des parvovirus jouerait un rôle majeur dans la détermination du tropisme tissulaire permettant l'entrée initiale dans la cellule hôte (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). La région à la surface du virus à proximité des axes de symétrie d'ordre 5 pourrait avoir une fonction commune chez le PPV, le CPV et le FPV, comme par exemple l'attachement au récepteur de la cellule hôte (Simpson *et al.*, 2002). Toutefois, c'est la grande variation des régions en surface des capsides qui supposent que chacune des espèces virales interagit avec différentes cellules hôtes (*Figure 1*) (Simpson *et al.*, 2002).

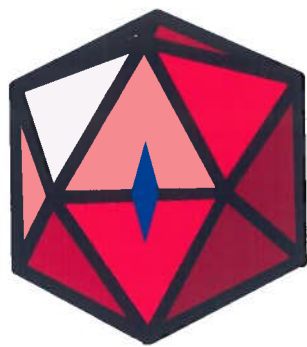
**Figure 1 : Structure de la capsid e parvovirale**

- A) Conservation des caractéristiques de surface du PPV relativement à FPV et MVM où le rouge représente les motifs les plus conservés et le bleu, les motifs les plus variables. Les axes de symétrie sont démontrés sur la microscopie cryoélectronique de la capsid e du PPV.
- B) Représentations des axes rotationnels d'ordre 2, 3 et 5 définissant la symétrie icosaédrale.

A)



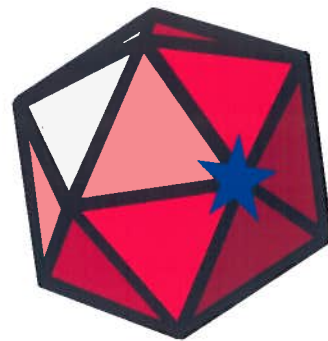
B)



**Axe-2**



**Axe-3**



**Axe-5**

### 2.3. Génome du Parvovirus Porcin

Le génome de la souche NADL-2 du parvovirus porcin est formé d'une molécule d'ADN linéaire simple brin d'une longueur de 5075 nucléotides (Tijssen *et al.*, 1995). Le brin encapsidé est habituellement d'une seule polarité soit le brin négatif (complémentaire à l'ARNm). Les particules parvovirales infectieuses contiennent une simple copie du génome non-permuté d'ADN dans lequel une relativement longue région codante (4-6 kb) est liée par de courtes séquences terminales palindromiques (121-421 bases) qui sont aptes à se replier en des structures secondaires bicaténares de type épingle à cheveux (Bourguignon *et al.*, 1976; Cotmore & Tattersall, 1995). À l'extrémité 3' du génome, la séquence permet un repliement à l'intérieur du palindrome en forme d'Y et peut dès lors servir d'amorce durant les étapes précoces de la réplication (génération d'un ADN double-brin nécessaire à la transcription) en plus de moduler l'activité d'un des promoteurs viraux (Bourguignon *et al.*, 1976; Tijssen *et al.*, 1995). À l'autre extrémité, l'épingle à cheveux en 5' joue un rôle crucial dans la réplication virale par son implication dans le mécanisme de l'épingle à cheveux roulante d'où résulte deux séquences alternatives de 44 nucléotides à l'intérieur de l'épingle (Tijssen *et al.*, 1995). En fait, les origines répliquatives associées à ces deux palindromes sont activées par des stratégies différentes d'initiation pour résulter en la synthèse de télomères soit dans une orientation simple désignée «flip» ou en une autre orientation inversement complémentaire appelées «flop» (Cotmore & Tattersall, 1995). Les séquences régulatrices et les autres séquences non-traduites impliquées dans la réplication du virus, la transcription ou l'encapsidation sont trouvées à chacun des extrémités du génome mais aussi chevauchent les séquences codantes (Tijssen *et al.*, 1995). La petite taille du génome et son potentiel d'encodage limité nécessite que ces virus utilisent un type de synthèse exceptionnel en renversant la machinerie de réplication de leur hôte eucaryotique pour leur propre amplification (Cotmore & Tattersall, 1995). De plus, l'usage du génome compact du PPV requiert l'utilisation de stratégies telles que l'épissage alternatif, la mise en commun de longs segments de génome ainsi que la maturation post-traductionnelle

### 2.3.1. Organisation génomique

L'organisation génomique du PPV ressemble à celle du MVM et du H-1 mais particulièrement, dû à la localisation des sites d'épissages, à celles du CPV, MEV et FPV (Tijssen *et al.*, 1995). La *figure 2* démontre que le génome est organisé en deux grands cadres de lecture ouverts couvrant la presque totalité de celui-ci et deux petits cadres de lecture ouverts. Tous les cadres de lecture ouverts (ORF) se retrouvent sur un seul des deux brins de l'ADN répliatif. Le grand ORF de gauche code pour les protéines non-structurales (NS) tandis que celui de droite est codant pour les polypeptides structuraux (VP) (Tijssen *et al.*, 1995). Ces cadres de lecture sont situés dans la même orientation sur le brin positif mais consistent en deux unités de transcription distinctes ayant chacun leur propre promoteur (Cotmore & Tattersall, 1987).

### 2.3.2. Unités transcriptionnelles

Le PPV comporte deux gènes chacun codant pour plusieurs produits. La transcription virale est sous le contrôle de deux promoteurs (P4 et P40) et les transcrits des gènes co-terminent près de l'extrémité 5' du brin négatif (*Figure 2A*) (Tijssen *et al.*, 1995 et 1999). Les transcrits R1 (4.7 kb) et R2 (3.3 kb) sont générés à partir du promoteur P4 et codent pour NS1 (83 kDa) et NS2 (24 kDa) respectivement (Bergeron *et al.*, 1993; Pintel *et al.*, 1995; Tijssen *et al.*, 1999). À partir de son initiation au nucléotide 260 jusqu'au nucléotide 514, NS2 est codée dans le même cadre de lecture ouvert que NS1 (Naeger *et al.*, 1993). Une particularité des transcrits provenant du P4 est que les transcrits non-épissés et épissés sont aussi traduits (NS1 et NS2/NS3, respectivement) (Tijssen *et al.*, 1999). Un troisième transcrit d'une protéine potentielle non-structurale est observée pour le PPV soit NS3, qui a le même N-terminal que NS1 et NS2 mais dont le cadre de lecture du domaine C-terminal chevauche le cadre de lecture ouvert des protéines structurales (Tijssen *et al.*, 1999). Le promoteur P40 génère tant qu'à lui les transcrits R4 (2.9 kb) qui codent pour les protéines de la capsid virale VP1 et VP2 (Bergeron *et al.*, 1993; Pintel *et al.*, 1995; Tijssen *et al.*, 1999).

### 2.3.3. Épissage alternatif

L'épissage alternatif a pour but d'augmenter la capacité codante du génome en plus de moduler le niveau d'expression des protéines virales (Pintel *et al.*, 1995). En effet, la majorité des produits viraux ne proviennent pas des transcrits primaires mais plutôt de transcrits épissés. Le promoteur P4 produit le transcrit primaire codant pour les protéines non-structurales qui comporte deux types d'introns soit un type regroupant deux petits introns et un autre type constitué de seulement un grand intron. Les deux petits introns se chevauchent dans la région en aval des régions codantes des protéines NS (*Figure 2A - «a» et «b»*) et peuvent être épissés de façon alternative jouant ainsi un rôle déterminant dans l'expression des protéines (Bergeron *et al.*, 1993). Leur localisation en regard des codons d'arrêt des protéines NS est cruciale. Ils sont également présents sur le transcrit primaire produit par le promoteur P40 servant ainsi à l'expression des protéines de la capsidie et vont déterminer quelle VP sera synthétisée à partir du transcrit R4 (Tijssen *et al.*, 1995). Le grand intron, tant qu'à lui, recouvre la majeure partie du cadre de lecture de ces polypeptides non-structuraux (*Figure 3A- c et d*) (Bergeron *et al.*, 1993).

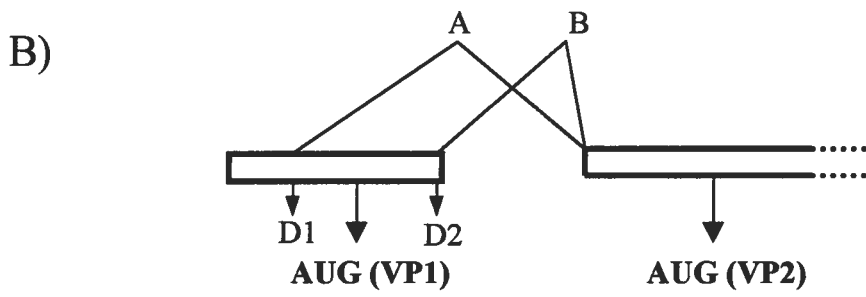
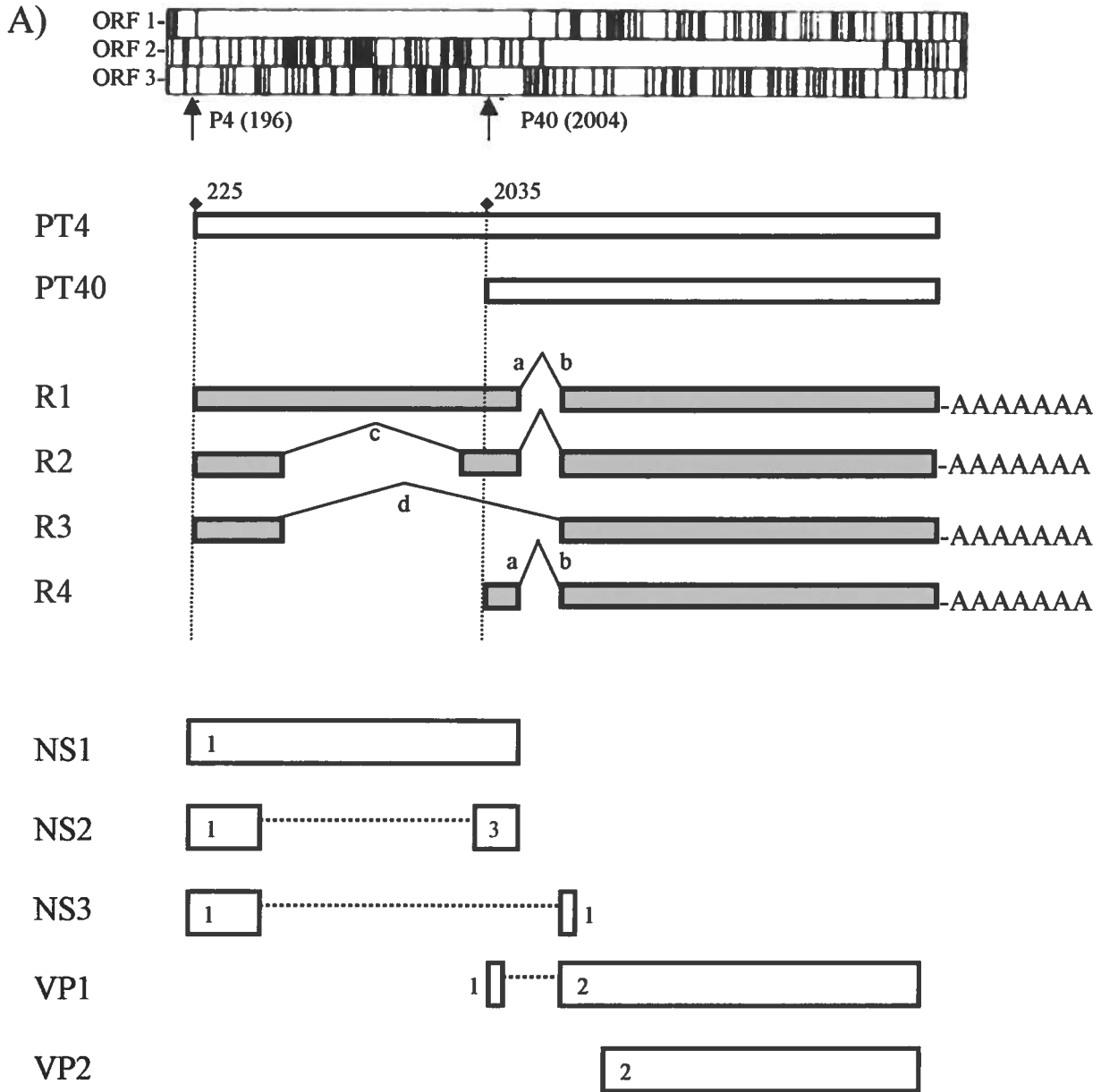
L'épissage des parvovirus est souvent gouverné par l'utilisation de séquences non-consensus acceptrices ou donneuses (*Figure 2B*) (Tijssen *et al.*, 1995). Contrairement à MVM, les petits introns du PPV sont délimités par deux sites donneurs et seulement un site accepteur (Pintel *et al.*, 1995). Alors, les deux sites donneurs (2280 et 2313) sont alternativement épissés au même site accepteur. Le premier site donneur D1 (2280-AG/GT) est localisé immédiatement en aval des codons d'arrêt de NS1 et NS2 et seulement à quelques nucléotides en amont du codon d'initiation de la VP1 (2287-ATG) (Bergeron *et al.*, 1993; Tijssen *et al.*, 1999) Le site donneur alternatif D2 (2313-AG/GT) se situe lui en aval de ce codon de départ. Conséquemment, un épissage de type A ou de type B utilisant les sites donneurs D1 et D2, respectivement, avec le site accepteur commun A1 (2386-AG/GA) aura pour effet d'éliminer ou de préserver le codon d'initiation de la VP1 et de générer soit VP2 ou VP1 (Bergeron *et al.*, 1993; Tijssen *et al.*, 1999). L'abondance relative des protéines structurales est donc déterminée par l'épissage alternatif de ces petits introns (Pintel *et al.*, 1995).

Pour ce qui est des protéines non-structurales du PPV, le motif d'épissage est relativement similaire à celui observé chez des parvovirus apparentés (Bergeron *et al.*, 1993) Cependant, il y a des différences importantes qui se doit d'être mentionnées. Le MVM ainsi que les autres parvovirus du groupe RV-like possèdent un deuxième site accepteur entraînant ainsi une augmentation dans les combinaisons de patrons d'épissage (Pintel *et al.*, 1995). De plus, comme les petits introns chevauchant se situent à l'intérieur du cadre de lecture spécifique à NS2, plusieurs isoformes de ce polypeptide peuvent être obtenu (Pintel *et al.*, 1995). La NS2 du PPV n'a pas cette hétérogénéité mais cette absence d'isoforme semble être compensée par l'épissage du transcrit R3 (2.9 kb), présent uniquement chez le PPV, produisant ainsi la NS3 (Bergeron *et al.*, 1993). Finalement, les transcrits R1 et R2 chez le parvovirus porcin donnant naissance à NS1 et NS2 ne nécessitent aucune réaction d'épissage puisque leur séquence codante se termine avant les sites des petits introns contrairement à d'autres parvovirus où le transcrit R2 se doit de subir l'excision du grand intron afin de donner NS2 (Pintel *et al.*, 1995).

**Figure 2 :** *Organisation génomique du parvovirus porcine*

- A) *L'illustration du haut démontre que ce génome est organisé en trois cadres de lecture ouverts (ORF) où chacun des codons d'arrêt sont représentés par les lignes verticales. Les promoteurs P4 et P40 sont aussi identifiés à l'aide de flèches. Il est possible de distinguer les deux transcrits primaires (PT4 et PT40) ainsi que les quatre différents patrons d'épissage (annotations «a» à «d») résultant en transcrits épissés de R1 à R4. Les protéines virales sont tant qu'à elles illustrées selon les régions du génome et représentées en fonction du numéro de cadre de lecture qui les encode.*
- B) *Épissage alternatif des petits introns.*  
*Les sites donneurs D1 et D2 dictent quel patron d'épissage, A ou B, sera utilisé. Le choix du D1 fera en sorte qu'il y ait utilisation du patron «A», engendrant l'élimination du codon de départ de la VP1 et l'utilisation de celui de la VP2 afin de générer cette protéine de structure. Le choix du donneur D2 signifie que le patron d'épissage utilisé est «B» engendrant ainsi la formation de la protéine VP1 puisque le codon de départ de la VP1 est conservé.*





## 2.4. Protéines virales

### 2.4.1. Protéines non-structurales

La NS1 est une phosphoprotéine nucléaire stable d'une masse moléculaire évaluée à 83 kDa qui est codée par l'ARNm viral R1 chez le PPV (Naeger *et al.*, 1990; Bergeron *et al.*, 1993). La NS1 est le premier polypeptide spécifique au PPV à être exprimé soit bien avant l'initiation de la synthèse des protéines de la capsid (Molitor *et al.*, 1985). L'apparition précoce de la NS1 coïnciderait avec l'initiation de la réplication de l'ADN du parvovirus (Molitor *et al.*, 1985). À ce jour, la fonction de NS1 chez le parvovirus porcin n'est pas bien définie. Cependant, il est possible de supposer qu'elle joue un rôle similaire à la NS1 des autres membres du groupe RV-like vu leur grande homologie (Tijssen *et al.*, 1995). Alors, les fonctions attribuées à la NS1 de ces parvovirus sont variées. Il est à noter, entre autre, que ce polypeptide pléiotropique est essentiel à la réplication productive dans tous les types de cellules (Cotmore & Tattersall, 1995). Les molécules NS1 agissent en tant que trans-activatrices de transcription à partir des promoteurs viraux en plus de moduler l'activité de promoteurs hétérologues variés et de servir un grand nombre, quoique pauvrement définie, de fonctions cyostatiques ou cytotoxiques (Cotmore & Tattersall, 1995). De plus, plusieurs activités biochimiques nécessaires aux étapes variées du cycle de vie viral lui sont attribuées telles que attachement à l'ATP, ATPase, attachement à l'ADN de manière covalente et non-covalente, hélicase et endonucléase à site spécifique (Vanacker & Rommelaere, 1995). En plus des rôles importants dans la réplication virale, NS1 est aussi une importante régulatrice/trans-activatrice de l'expression des gènes viraux en interagissant avec le facteur de transcription Sp1 (Tijssen *et al.*, 1995). NS1 est donc requise pour la réplication de l'ADN parvoviral et pour la régulation de l'initiation de la transcription (Vanacker & Rommelaere, 1995).

La NS2 est une phosphoprotéine cytoplasmique codée par l'ARNm du transcrit R2 dont la masse moléculaire est estimée à 25 kDa (Naeger *et al.*, 1990 et 1993; Cotmore & Tattersall, 1995). Contrairement à la NS1, il est plutôt difficile d'extrapoler chez le PPV les fonctions du polypeptide NS2 démontrées pour certains parvovirus autonomes

puisque des isoformes de NS2 sont absentes chez celui-ci (Pintel *et al.*, 1995; Bergeron *et al.*, 1993). En effet, trois isoformes différentes sont retrouvées pour la plupart des parvovirus selon les patrons d'épissage utilisés tandis que seulement une protéine NS2 existe chez le PPV (Pintel *et al.*, 1995). Il en demeure pas moins que les fonctions de cette protéine ne sont pas clairement déterminées comme celles de la NS1 (Vanacker & Rommelaere, 1995). En effet, il n'y a pas d'évidence directe qui a été présentée démontrant le rôle exact de cette protéine dans l'expression des gènes viraux ou la réplication virale (Naeger *et al.*, 1990). Les fonctions de la NS2 suspectées chez les parvovirus rongeurs sont une quelconque implication lors de la réplication du génome, la régulation de synthèse des protéines virales et même lors de l'assemblage des capsides virales (Naeger *et al.*, 1990; Li & Rhode III, 1991 et 1993; Naeger *et al.*, 1993; Cotmore *et al.*, 1999). NS2 ne semble pas jouer un rôle significatif dans la transcription virale mais posséderait des effets cytotoxiques (Naeger *et al.*, 1990 et 1993). NS1 et NS2 seraient toutefois essentielles à la régulation du cycle de vie du virus (Vanacker & Rommelaere, 1995).

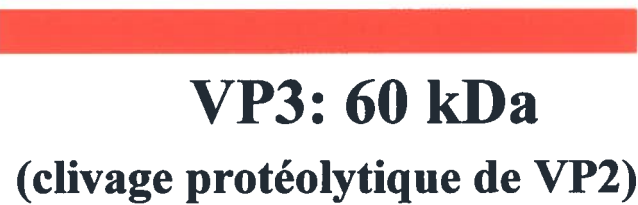
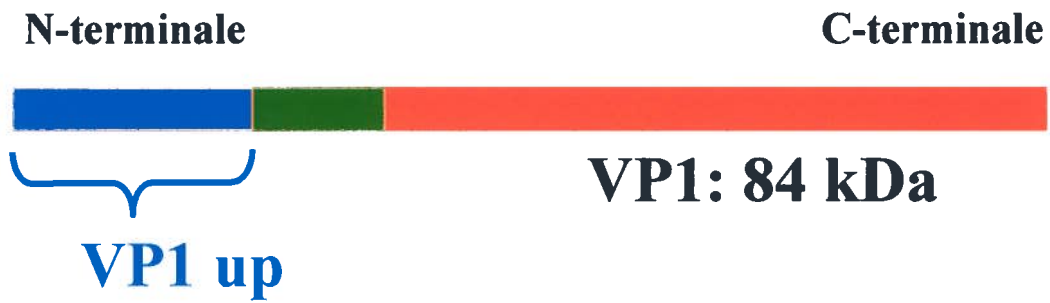
Une troisième protéine potentielle non-structurale produite par le transcrit R3 est observée uniquement chez le PPV, soit la NS3, possédant un domaine N-terminal commun à NS1 et NS2 (Tijssen *et al.*, 1999). Toutefois, la production de ce polypeptide ne fut jamais démontrée même si le transcrit a été identifié et séquencé. Ainsi, aucune fonction spécifique lui est attribuée mais il est probable, selon Bergeron et ses collaborateurs (1993), que cette protéine soit présente afin de compenser l'absence d'isoformes de NS2.

#### **2.4.2. Protéines structurales**

Chez les parvovirus, tous les déterminants relatifs aux tropismes cellulaires ou tissulaires, aux barrières d'hôtes, de même qu'aux propriétés d'hémagglutination sont localisés à l'intérieur des protéines de la capside (Parrish, 1991; Chang *et al.*, 1992; Truyen & Parrish, 1992; Vasudevacharya & Compans, 1992; Bergeron *et al.*, 1996). Ces polypeptides structuraux formant la capside sont au nombre de trois chez le parvovirus

porcin soit VP1, VP2 et VP3. Les masses moléculaires estimées pour ces protéines sont de 84 kDa, 64 kDa et 60 kDa, respectivement (Tijssen *et al.*, 1995 et 1999). Il existe une homologie de séquence pour ces protéines; elles partagent une même portion C-terminale où la séquence de VP3 est retrouvée intégralement chez la VP1 et la VP2, et ne diffèrent que par la longueur de leur extrémité N-terminale, faisant référence à la région unique de ces dernières (*Figure 3*) (Tattersall *et al.*, 1977; Brown & Salzman, 1984; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). En effet, la VP1 possède 729 résidus d'acides aminés dont 150 forment la portion unique de l' amino-terminale absente chez la VP2 (Cotmore *et al.*, 1999; Lombardo *et al.*, 2000; Simpson *et al.*, 2002). De la même façon, la VP2 possède aussi une séquence additionnelle en N-terminale d'environ 20 a.a. comparativement à la VP3. Bien que ce soit l'épissage alternatif qui est responsable de la synthèse de VP1 ou VP2, le troisième polypeptide est généré lui au niveau des virions matures par un clivage protéolytique des molécules VP2 approximativement à 25 a.a. de la région N-terminale (Clinton & Hayashi, 1975; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998; Cotmore *et al.*, 1999). La maturation protéolytique de VP2 en VP3 est observée uniquement chez les capsides pleines et non chez les particules vides (Agbandje *et al.*, 1995; Cotmore *et al.*, 1999). De plus, ce même site protéolytique est présent dans les molécules VP1 mais il demeure inaccessible au clivage suggérant ainsi que les séquences équivalentes de ces peptides sont disposées différemment dans la structure du virion (Cotmore *et al.*, 1999).

**Figure 3 :** *Protéines structurales VP1, VP2 et VP3*  
*Représentation schématique des trois protéines de structure composant la capsid du parvovirus porcin où l'orange représente la partie commune aux protéines; le vert, la région de la protéine VP2 (VP2 up) absente de la VP3 et le bleu, le domaine spécifique de la protéine VP1 (VP1 up).*



### 3. CYCLE VIRAL

Les grandes étapes du cycle de reproduction viral peuvent être définies en terme d'interaction entre le virus et la surface cellulaire (attachement), d'entrée du virus dans la cellule par divers mécanismes d'endocytose (pénétration), de transport intracellulaire du virus et de décapsidation. La mise en oeuvre du cycle viral proprement dit soit la réplication du génome viral, la transcription et la traduction des gènes viraux, l'encapsidation et finalement, la libération du virus vient ensuite (Cotmore & Tattersall, 1987). Les premières étapes d'une infection, c'est-à-dire l'adsorption et la pénétration, ne requièrent pas de fonctions virales spécifiques, mais plutôt des processus cellulaires normaux (Tijssen *et al.*, 1999). Les parvovirus dépendent initialement de la cellule cible afin de compléter leur cycle viral. La nécessité d'infecter les cellules durant la phase de synthèse de l'ADN de l'interphase cellulaire (phase S) s'impose vu leur incapacité de stimuler les cellules au repos d'entrer en phase de division cellulaire (Doerig *et al.*, 1990; Tijssen *et al.*, 1999). Plusieurs déterminants viraux et facteurs cellulaires sont impliqués dans les événements du cycle viral rendant l'élucidation des mécanismes d'infection plus complexe. De plus, comme le tropisme viral repose sur diverses caractéristiques, une modification de celles-ci peut influencer la capacité du virus à mener une infection productive et même engendrer un changement du spectre d'hôte. Dans l'étude de la permissivité cellulaire, les parvovirus peuvent pénétrer autant dans les cellules non-permissives que dans les cellules permissives, une étape subséquente à l'entrée des particules doit donc être responsable du déclenchement de l'infection productive (Parker *et al.*, 2001). Malgré le peu de connaissance à propos des stratégies employées par les parvovirus pour traverser les membranes de leurs cellules hôtes et le cytosol dans le but de livrer leur génome à la machinerie de réplication nucléaire, quelques possibilités furent émises.

### 3.1. Événements précoces

Les étapes précoces de l'entrée du virus à l'intérieur des cellules impliquent une série d'événements séquentiels débutant par l'attachement du virion aux récepteurs à la surface de la cellule suivi par la pénétration du virion ou de ses composantes à travers la membrane plasmique ou la membrane d'une vésicule endocytique jusqu'au cytoplasme (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997; Parker & Parrish, 2000). Les étapes précoces de l'infection par les parvovirus sont peu comprises en général à part certains travaux portant sur l'internalisation du CPV.

#### 3.1.1. Adsorption à la cellule hôte

Bien qu'une infection virale productive soit initiée par l'adsorption du virion aux récepteurs spécifiques situés à la surface de la cellule hôte, très peu est connu sur la nature exacte des récepteurs cellulaires pour le PPV. Les récepteurs identifiés jusqu'à maintenant pour certains parvovirus incluent le récepteur-1 du facteur de croissance du fibroblaste humain, le sulfate d'héparine et l'intégrine  $\alpha V\beta 5$  pour le virus associé à un adénovirus (AAV) et le récepteur transferrine pour le CPV (Brown *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 2001). Pour ce qui est du MVM, des résidus d'acide N-acétyl-neuraminique semblent jouer un rôle essentiel dans le processus infectieux de ce virus puisqu'un traitement à la neuramidase interfère avec l'infection (Cotmore & Tattersall, 1987 et 1989; Barbis *et al.*, 1992). Il apparaît donc que le récepteur pour le MVM serait une sialoglycoprotéine (Basak & Turner, 1992). De plus, le CPV et le FPV peuvent infecter les cellules félines et de vison, indiquant ainsi qu'ils partagent probablement un récepteur commun et une même voie d'infection dans ces cellules (Parker *et al.*, 2001). Le B19 tant qu'à lui requiert la présence d'un glycolipide, le globoside, pour infecter les cellules progénitrices d'érythroïdes humaines (Simpson *et al.*, 2002). Dans le cas du PPV, un anticorps monoclonal est capable de se lier à une molécule membranaire de 40 kDa présente sur des cellules testiculaires de porc permissives de même que sur plusieurs autres lignées cellulaires non-permissives et a la capacité d'inhiber l'attachement du virus de façon



compétitive (Harding & Molitor, 1992). Toutefois, cette protéine ne fut jamais caractérisée en détail et désignée comme étant un récepteur viral potentiel.

Des travaux réalisés par plusieurs chercheurs ont suggéré que la permissivité cellulaire aux infections par la majorité des parvovirus ne dépend pas nécessairement des récepteurs cellulaires associés à la membrane. Les mécanismes régissant le tropisme sont plutôt subséquents à l'étape d'internalisation du virus puisque l'entrée virale ne semble pas différer entre les cellules permissives et non-permissives (Ridpath & Mengeling, 1988; Basak & Turner, 1992; Oraveerakul *et al.*, 1992). Il fut alors proposé que les étapes suivant l'internalisation soient cruciales pour l'infection et que des facteurs intracellulaire agissent à ce niveau (Basak & Turner, 1992; Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). La restriction du PPV pour certaines cellules hôtes se situe dans les événements intracellulaires plutôt qu'à une liaison spécifique du virus à la surface de la cellule hôte. Ces événements intracellulaires n'ont cependant pas été élucidés chez le PPV (Oraveerakul *et al.*, 1992).

### **3.1.2. Internalisation du virus et transport vers le noyau**

Le mécanisme d'entrée cellulaire de la plupart des virus non-enveloppés demeure incompris (Zádori *et al.*, 2001; Basak & Turner, 1992). Plusieurs études portant sur le CPV, l'AAV et le PPV ont postulé que ces virus chemineraient à travers divers compartiments du système endosomal. L'internalisation des parvovirus impliquerait l'endocytose par l'intermédiaire d'un récepteur dépendant de dynamine suivi par une circulation intracellulaire lente (Zádori *et al.*, 2001).

Suite à l'interaction avec le récepteur, il a été démontré que le parvovirus canin entre dans les cellules par une voie endocytiqye dynamine-dépendante via des vésicules tapissées de clathrines (Parker *et al.*, 2001). Les capsides virales transiteraient ensuite dans les vésicules de recyclage périnucléaires des cellules vu leur colocalisation en peu de temps suivant l'entrée à l'aide d'un marqueur pour ce type de compartiment, soit la transferrine (Parker *et al.*, 2001). Ces vésicules ne semblent pas être la destination finale du virus depuis que le PPV fut localisé dans les organelles endocytiques identifiées par la glycoprotéine lysosomale majeure, LAMP-2, soit les endosomes tardifs et les lysosomes

(Zádori *et al.*, 2001). De plus, des traitements bloquant le transport endosomal précoce à tardif (bafilomycine A1, nocodazole, basse température) inhibent l'infection virale suggérant que le passage du CPV aux endosomes tardifs, processus dépendant des microtubules, est requis pour une infection productive (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998; Zádori *et al.*, 2001). Ainsi, la livraison du PPV démontrée avec LAMP-2 positive aux endosomes/lysosomes tardifs confirme que le PPV entre dans la cellule via la voie endocytaire classique, en accord avec les autres parvovirus (Zádori *et al.*, 2001). Le CPV passe aussi par un compartiment acide pour initier une infection productive (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). En effet, l'infection par le CPV peut être bloquée dans les cellules traitées avec du  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ou de la chloroquine indiquant que l'acidification des endosomes serait nécessaire (Parker & Parrish, 2000). Toutefois, la structure de la capsid ne semble pas être directement affectée par une exposition à de faible pH laissant supposer que cette acidification ne soit qu'une condition indirecte telle que l'évolution naturelle des compartiments endosomaux ou simplement l'activation des protéases (Parker & Parrish, 2000).

Les études portées sur le AAV témoignent de l'usage de mécanismes semblables au CPV et au PPV (Douar *et al.*, 2001). Il y fut démontré que l'acidification serait requise pour la transition endosomale précoce à tardif, c'est-à-dire qu'un faible pH endosomal favoriserait le relâchement des particules AAV (Douar *et al.*, 2001). Cependant, l'implication d'un autre élément présent dans les endosomes est suspecté dans le processus infectieux depuis qu'une micro-injection directement dans le cytoplasme de particules virales pré-traitées en milieu acide ne résulte pas en une infection productive (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). Il semble donc évident que le transit via le système endosomal est indispensable pour une infection productive et avantageux à utiliser depuis que les particules virales seraient directement livrées à la région périnucléaire mais plusieurs facteurs interagissant tout au long de cette route demeurent inconnus (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998; Douar *et al.*, 2001).

### 3.1.3. Décapsidation et livraison de l'ADN viral

L'absence presque totale d'ADN monocaténaire libre dans le cytoplasme laisse présumer que peu de virus sont décapsidés. Il semble ainsi que la décapsidation finale et la libération de l'ADN viral aient lieu principalement à l'intérieur du noyau (Basak & Turner, 1992; Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). L'ADN viral serait livré au noyau, soit à partir du compartiment endocytique ou du cytoplasme, d'une manière ou d'une autre les mécanismes moléculaires qui régulent la livraison au noyau demeurent incertains (Zádori *et al.*, 2001). Il se pourrait que MVM, par exemple, entre dans le noyau comme un virion intacte ou partiellement désassemblé en complexe ADN-protéine (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Des changements mineurs de conformation des boucles de surface du CPV peuvent survenir dans les endosomes, là même où une baisse importante de pH est observée. Cette étape permettrait d'amorcer la décapsidation des particules ou l'interaction avec de nouvelles composantes cellulaires (Simpson *et al.*, 2001). De plus, le rôle des changements conformationnels des protéines de la capsidie semble être très important dans la livraison des particules virales ou du génome à partir des endosomes (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998). Suivant le relargage à partir de ces compartiments, les virions partiellement décapsidés devraient être transportés au noyau pour l'initiation de la réplication. (Basak & Turner, 1992)

Il a été postulé que le virus soit transporté activement au noyau par un signal retrouvé sur les dix premiers acides aminés de la VP1 (Tijssen *et al.*, 1999). En effet, il est suggéré que VP1 soit requis pour le transport des parvovirus au noyau et que le signal de transport nucléaire soit localisé dans la région amino-terminale de la protéine de la capsidie VP1 du CPV (Cotmore & Tattersall, 1987; Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). La région unique N-terminale de la VP1 qui est riche en résidus basiques, typique de plusieurs protéines liant l'ADN, pourrait très bien être utilisée afin de transporter la particule arrivante ou l'ADN jusqu'aux pores nucléaires (Tullis *et al.*, 1993; Vihinen-Ranta *et al.*, 1997).

## 3.2. Réplication du génome

### 3.2.1. Réplication de l'ADN viral

La réplication du génome s'effectue dans le noyau. Cette réplication passe par trois étapes distinctes, soit la synthèse du brin d'ADN parental complémentaire, l'amplification de l'ADN de forme bicaténaire et enfin, l'encapsidation du brin d'ADN viral monocaténaire excisé (Tattersall & Cotmore, 1988). C'est par un système d'auto-amorçage à l'extrémité génomique 3' couplé à un mécanisme de transfert de la structure en épingle à cheveux formant ainsi la base du modèle original de réplication nommé «rolling hairpin» (épingle à cheveux roulante) que les parvovirus répliquent leur génome (Cotmore & Tattersall, 1995; Tattersall *et al.*, 1976). Les extrémités palindromiques de la structure linéaire simple brin du génome sont donc essentielles à ce modèle. Plusieurs intermédiaires bicaténaires ou contenant plusieurs copies du génome sont impliqués dans ce mécanisme en plus de requérir des protéines non-structurales codées par le virus même (Oraveerakul *et al.*, 1992). Comme il fut mentionné précédemment, en ayant une prédilection pour les cellules en division rapide, une réplication productive du génome viral prédomine seulement s'il y a initialisation de la phase S du cycle cellulaire par la cellule hôte (Jacoby *et al.*, 1996). De plus, la croissance des parvovirus est dépendante de l'état différencié de la cellule hôte, ce qui indique que l'expression régulée du développement des facteurs hôtes joue aussi un rôle dans la synthèse de nouveaux virions (Basak & Compans, 1989). Ainsi, l'habileté du parvovirus de se répliquer dans un hôte donné pourrait être due au pouvoir du virus d'exploiter les produits de l'hôte pour leur propre réplication (Parker *et al.*, 2001). Bien entendu, le succès de la multiplication de plusieurs virus dépend donc de leur habilité à avoir accès à la machinerie de réplication et de transcription confinée dans le noyau des cellules eucaryotiques (Lombardo *et al.*, 2000).

### 3.2.2. Expression des protéines virales

Les protéines non-structurales sont les principales à être associées aux différentes étapes d'expression des gènes viraux (Gardiner & Tattersall, 1988). C'est pourquoi les premiers gènes à être exprimés sont évidemment ceux des protéines non-structurales où leur promoteur P4 se voit être activé lorsque la cellule hôte entre en phase S. La transcription virale et la traduction résultent donc en la production des protéines NS en premier lieu, qui ensuite vont réguler à la hausse la synthèse des ADN viraux mais aussi des protéines de la capsid, VP, une fois le promoteur P40 activé par la NS1 (Doerig *et al.*, 1988; Jacoby *et al.*, 1996). Les protéines structurales suite à leur synthèse deviennent nécessaires pour l'accumulation de la progéniture d'ADN simple brin (Tullis *et al.*, 1993). De plus, l'interaction des polypeptides viraux avec les composantes importées de la machinerie nucléaire joue des rôles cruciaux dans le tropisme viral et le spectre d'hôtes (Lombardo *et al.*, 2000).

### 3.3. Assemblage des capsides et sortie du virus

#### 3.3.1. Transport des protéines structurales au noyau

En dépit du peu d'information concernant le transport de ces polypeptides au noyau, il semble possible de croire à l'existence d'une séquence présente sur les protéines structurales des parvovirus agissant à titre de signal de localisation nucléaire (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997; Lombardo *et al.*, 2000). En effet, la région N-terminale de la protéine VP1 du CPV possède une séquence impliquée dans le transport nucléaire de même que la VP2 du MVM. Cependant, chez MVM, cette séquence n'est pas suffisante pour le transport d'une protéine hétérologue jusqu'au noyau contrairement à celle présente chez la VP1 du CPV et le transport de la VP2 dépendrait possiblement d'un repliement protéique non observé chez la VP1 (Lombardo *et al.*, 2000). Ainsi, malgré la présence d'acides aminés identiques, ces protéines semblent se translocaliser au noyau en utilisant des mécanismes différents (Lombardo *et al.*, 2000).

### 3.3.2. Assemblage et encapsidation du génome

Pour l'assemblage des nouveaux virions, les protéines virales doivent entrer dans le noyau (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997). Il est par contre impossible de certifier si les protéines de la capsidite du parvovirus atteignent le noyau sous forme de monomères, de multimères ou de capsides déjà formées. Toutefois, les parvovirus semblent être à peine suffisamment petits (26 nm) pour passer à travers le complexe de pores nucléaires tout en restant intacts. Les pores nucléaires peuvent activement transporter des molécules d'un diamètre inférieur à 25 nm (Tullis *et al.*, 1993). Les forces d'interactions entre les protéines de la capsidite étant plus importantes parmi les sous-unités liées à l'axe de symétrie d'ordre 3 indiquent possiblement que les trimères soient un intermédiaire essentiel dans l'assemblage viral (Wu & Rossmann, 1993). Une fois les VP1 et les VP2 associées entre elles afin de former les capsides, l'ADN génomique peut être par la suite encapsidé à l'intérieur de ces capsides nouvellement formées (Jacoby *et al.*, 1996). Selon Tullis et ses collaborateurs (1993), la protéine structurale VP2 du MVM est nécessaire pour la formation des capsides et suffisante pour l'encapsidation de l'ADN viral simple brin. Toutefois, VP1 est requise afin d'obtenir des particules infectieuses (Tullis *et al.*, 1993). En effet, seule, la VP2 est capable de former des capsides encapsidant la progéniture d'ADN viral mais l'infectivité de la particule est sous la responsabilité de la VP1 présente au sein du virion nouvellement synthétisé (Lombardo *et al.*, 2000).

L'interaction entre le brin viral et la capsidite préformée pourrait bien aussi impliquée la molécule NS1. Les molécules NS1 sont présentes sur les extrémités 5' de chaque ADN simple brin nouvellement synthétisé et durant l'encapsidation, ces molécules demeurent à l'extérieur de la particule longée par une séquence de 24 nucléotides (Cotmore & Tattersall, 1995). Ceci suggère donc que NS1 pourrait servir d'intermédiaire lors de l'encapsidation en établissant une interaction primaire avec la particule vide et augmente les possibilités voulant que l'extrémité 5' soit insérée en premier au niveau de la capsidite (Cotmore & Tattersall, 1987 et 1995).

### 3.3.3. Relâchement des virions

Les mécanismes impliqués dans la sortie des virions nouvellement formés sont incertains mais ce relâchement semble être dû à un phénomène dépendant de la lyse cellulaire. En effet, en accord avec la plupart des autres virus non-enveloppés, le cycle viral productif chez les parvovirus est fort probable toujours lytique (Tattersall & Cotmore, 1988). En d'autres mots, la seule voie connue dans laquelle la progéniture virale peut être libérée à partir d'une cellule infectée et ainsi infecter une cellule voisine, est par la lyse et la mort cellulaire concomitante (Tattersall & Cotmore, 1988). La réplication virale généralement mènerait donc à la lyse cellulaire où les protéines non-structurales y furent associées et à la libération des nouveaux virions formés (Vanacker & Rommelaere, 1995; Jacoby *et al.*, 1996).

En conclusion, il est possible de supposer que l'entrée du virus implique au moins cinq différentes étapes comme il fut suggéré par Suikkanen et ses collaborateurs (2002) pour le CPV: (i) liaison au récepteur et jonction des cavités enrobées de clathrines à la surface de la cellule, suivi par l'incorporation dans les vésicules formées; (ii) entrée dans les endosomes précoces; (iii) transport à partir de la zone périphérique jusqu'à la région périnucléaire dans les endosomes de recyclage le long des microtubules de manière dépendante de dynéine; (iv) entrée virale à l'intérieur des vésicules LAMP-2 positives via les endosomes tardifs; et (v) relargage du matériel viral à partir de ces vésicules avant le transport jusqu'au noyau. La caractérisation des mécanismes entourant la décapsidation du virus ainsi que l'échappement des vésicules par celui-ci demeure incomplète jusqu'à présent.

## 4. PROTÉINE STRUCTURALE VP1

Comme il fut présenté précédemment, la VP1, soit un polypeptide d'une masse moléculaire de 84 kDa, comporte la séquence entière de la protéine de structure VP2 mais possède en plus une extension N-terminale additionnelle de 150 acides aminés chargés basiquement (Simpson *et al.*, 2002; Cotmore *et al.*, 1999). Ce domaine spécifique

à la VP1 est d'un intérêt absolu depuis l'observation récente par Zádori et ses collaborateurs (2001) d'un motif phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) présent au niveau de cette région spécifique chez le PPV et de son implication probable dans l'infectivité virale.

#### 4.1. Région unique de la protéine VP1

Les parvovirus possèdent une séquence en acides aminés fortement conservée à travers l'évolution. Ce domaine d'environ 40 acides aminés présent dans la région unique de la VP1 est hautement conservé parmi tous les membres de la famille *Parvoviridae* (Zádori, 2001). Cette similarité de séquence dans la région N-terminale fut donc observée pour plusieurs parvovirus tels que le CPV, le PPV, le BPV, de même que chez la plupart des parvovirus rongeurs (*Figure 4*) (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002).

Récemment, un motif PLA<sub>2</sub> conservé ressemblant au site catalytique de PLA<sub>2</sub> sécrétées a été identifié par alignement de séquences des VP1 up de plusieurs parvovirus incluant AAV-2 (Zádori *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2002). Ce fut Zádori et ses collaborateurs (2001) qui démontrèrent que quelques résidus aminés dans le domaine conservé de la VP1 up correspondent à des acides aminés cruciaux retrouvés dans le site catalytique de la phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée (sPLA<sub>2</sub>), une activité qui n'était pas connue existante dans les capsides de virus. En fait, certains de ces acides aminés sont systématiquement retrouvés à la même position chez presque tous les parvovirus. La conclusion suivante a alors été émise, la famille des phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées possède une certaine homologie de séquence avec celle des parvovirus pour des acides aminés retrouvés au site catalytique de la PLA<sub>2</sub>.

Donc, une activité PLA<sub>2</sub> fut associée à la séquence N-terminale de la VP1 pour plusieurs parvovirus suggérant ainsi une implication dans le relâchement des virus à partir des endosomes tardifs durant l'infection (Zádori *et al.*, 2001; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002).



**Figure 4 :** *Séquences N-terminales de diverses VPI*  
*Alignement de séquences N-terminales de la VPI de divers parvovirus apparentés tels que le CPV (Canine Parvovirus), le PPV (Porcine Parvovirus), le MVM (Minute Virus of Mice), le MPV (Mouse Parvovirus) et le BPV (Bovine Parvovirus).*

**CPV ⇒ MAPPAKR..ARRGLVPPGYKYLGPNSL**

**PPV ⇒ MAPPAKR..AR.GLTLPGYKYLGPNSL**

**MVM ⇒ MAPPAKR..AKRGWVPPGYKYLGPNSL**

**MPV ⇒ MAPPAKR..AKRGWVPPGYKYLGPNSL**

**BPV ⇒ M.PPTNKANSKKGLTLPGYNYLGPNSL**

*(Vihinen-Ranta & al., 2002)*

#### 4.1.1. Phospholipase A<sub>2</sub> et activité enzymatique

Les PLA<sub>2</sub> sont très répandues dans la nature formant une famille de protéines de fonctions et de sources très diversifiées. Elles peuvent être retrouvées dans plusieurs organismes différents et organes comme des enzymes intracellulaires ou sécrétées soit par exemple dans le venin d'abeilles ou les PLA<sub>2</sub> pancréatiques (Yu *et al.*, 1990; Dennis, 1997; Dorsch *et al.*, 2002). Les phospholipases A<sub>2</sub> sécrétées forment donc une superfamille d'enzymes clés impliquées dans des processus physiologiques variés tels que le métabolisme des lipides membranaires mais aussi dans la pathogénie de l'inflammation, des processus auto-immuns, d'hypersensibilité aiguë et dans les maladies dégénératives (Przanski & Vadas, 1991; Dennis, 1997; Balsinde *et al.*, 1999). Elles peuvent provenir par exemple du liquide synovial humain chez des patients atteints d'arthrite rhumatoïde, du liquide pancréatique, du venin de serpent, de lézard et d'abeille (Tischfield, 1997; Dennis, 1997; Zádori *et al.*, 2001). Il est donc possible de retrouver les phospholipases A<sub>2</sub> chez les procaryotes, les protistes, les animaux et les plantes variant beaucoup en longueur et au niveau structurelle (Girod *et al.*, 2002). Ces enzymes peuvent être divisés à l'intérieur de trois principaux groupes basés sur leurs propriétés biologiques résultant en diverses fonctions soit les PLA<sub>2</sub> sécrétées, les PLA<sub>2</sub> dépendantes du Ca<sup>2+</sup> cytosolique et les PLA<sub>2</sub> indépendantes du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Dennis, 1997; Girod *et al.*, 2002).

Les fonctions des PLA<sub>2</sub> peuvent être variées même si l'activité enzymatique de la PLA<sub>2</sub> est principalement de catalyser l'hydrolyse d'une chaîne d'acides gras au niveau du deuxième carbone d'un phospholipide soit le lien 2-acyl ester (sn-2) libérant un acide gras libre et une molécule de lysophospholipide (*Figure 5*) (Balsinde *et al.*, 1999; Zádori *et al.*, 2001; Dorsch *et al.*, 2002; Girod *et al.*, 2002). Dans certains cas, à partir des phospholipides de membrane, l'acide gras libre généré est un acide arachidonique constituant un intermédiaire lors de la synthèse des eicosanoïdes, des prostaglandines et des leucotriènes impliqués dans la pathophysiologie de plusieurs maladies spécialement les maladies inflammatoires (Yu *et al.*, 1990; Reynolds *et al.*, 1992; Dorsch *et al.*, 2002).

La présence d'acides aminés du site catalytique de la PLA<sub>2</sub> dans la région unique de la VP1 des parvovirus et la présence d'anticorps antiphospholipides chez les patients

atteints de maladies auto-immunes parfois associées à une infection au B19, suggère qu'un lien existerait entre l'infection parvovirale et maladie auto-immune (Lunardi *et al.*, 1998; Naides, 1998). Dans le même ordre d'idées, Loizou et ses collaborateurs (1997) ont démontré une remarquable similarité dans la spécificité des anticorps antiphospholipides entre les patients infectés par le B19 et ceux atteints de lupus systémique érythémateux. Ces investigations soulèvent donc une question à savoir si une infection parvovirale pourrait être le déclencheur du développement d'anticorps antiphospholipides dans les maladies auto-immunes (Uthman & Gharavi, 2002).

#### **4.1.2. Localisation du peptide spécifique à VP1**

La localisation du peptide spécifique à la protéine VP1 diffère d'un parvovirus à l'autre. En effet, dans le cas du B19 et du GmDENV, la portion amino-terminale de la VP1 est localisée à la surface du virion de même que possiblement pour l'AAV tandis que pour le CPV et le MVM, elle n'est pas accessible à la surface de la capsid et donc résiderait à l'intérieur du virion (Rosenfeld *et al.*, 1992; Chapman & Rossmann, 1993; Cotmore *et al.*, 1999; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). En effet, Cotmore et ses collaborateurs (1999) ont démontré que la région aminée propre à VP1 du MVM est séquestrée et réside à l'intérieur de la capsid et n'est pas accessible de l'extérieur. Elle serait positionnée ainsi dans la majorité des particules pleines ou vides de MVM nouvellement synthétisées (Cotmore *et al.*, 1999). Ils ont toutefois aussi fait la démonstration que la VP1 up peut être externalisée d'une particule intacte (Cotmore *et al.*, 1999). En fait, les peptides spécifiques à VP1 devenaient accessibles dans les virions complets mais non dans les particules vides, suivant une exposition à la chaleur (Cotmore *et al.*, 1999).

Dans plusieurs groupes de virus, la structure virale a été démontrée à être métastable, alors qu'une exposition à une source externe d'énergie, qui est souvent expérimentalement sous forme de chaleur, induit celle-ci à subir des transitions conformationnelles limitées imitant possiblement les changements structuraux observés chez le virion infectieux durant le processus d'entrée cellulaire (Cotmore *et al.*, 1999). C'est donc suite à un chauffage limité ou à un traitement à l'urée qu'il fut possible

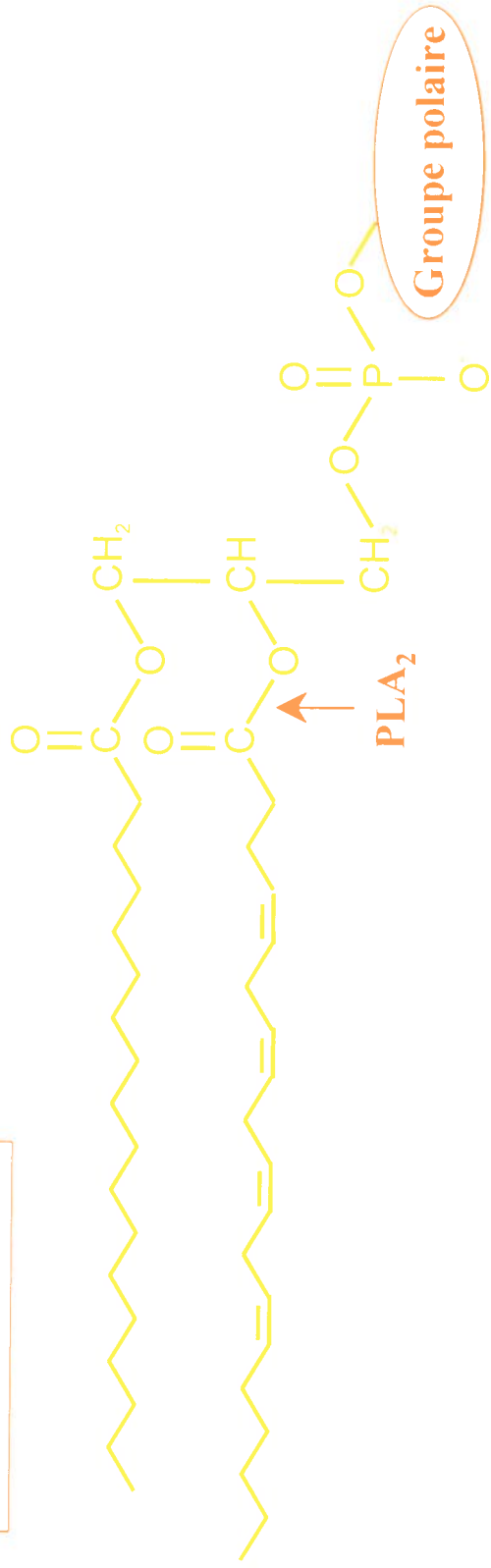
d'exposer la séquence N-terminale unique à VP1 du MVM et du CPV sans désintégration complète de la capsid (Weichert *et al.*, 1998; Cotmore *et al.*, 1999; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). De plus, selon les résultats obtenus par Agbandje-McKenna et ses collaborateurs (1998), les virions complets mais non les capsides vides peuvent être précipités utilisant des anticorps dirigés contre les peptides de la région unique à VP1 suivant l'exposition des particules virales à la chaleur. Cette région normalement séquestrée à l'intérieur du virion devenait exposée lors d'un choc thermique sans réarrangement substantiel du reste de la carcasse virale (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998).

Plusieurs hypothèses découlent de ces observations à savoir comment ce domaine spécifique comportant le motif PLA<sub>2</sub> serait externalisé et quel serait le stimulus naturel qui engendrait cette exposition. Il fut donc proposé que les cellules susceptibles contiendraient un facteur déstabilisant le virion et qui serait requis pour l'externalisation de la VP1 up ou que le milieu lysosomal acide pourrait faciliter les changements conformationnels de la capsid virale et conséquemment, l'exposition de la région unique de la VP1 (Zádori *et al.*, 2001). Toujours selon la littérature, la présence d'une séquence riche en glycines au niveau du canal de l'axe de symétrie d'ordre 5 du MVMi pourrait stipuler un mécanisme possible pour expliquer comment la région unique N-terminale de la VP1 serait externalisée dans les parvovirus infectieux (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Finalement, Zádori et ses collaborateurs (2001) émirent la constatation suivante où l'absence de ponts disulfures dans la phospholipase A<sub>2</sub> parvovirale putative (pvPLA<sub>2</sub>), contrairement à toutes les PLA<sub>2</sub> sécrétées connues, pourrait faciliter cette externalisation à travers le canal cylindrique de l'axe de symétrie d'ordre 5 à la surface des capsides. Ainsi, par un quelconque mécanisme, la région unique de VP1 pourrait être exposée à la surface de la capsid à l'intérieur des cellules durant le processus d'infection (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002).

Comme aucune activité PLA<sub>2</sub> ne fut détectée au niveau des particules virales nouvellement formées chez le PPV, il est possible de supposer que la VP1 up n'est pas accessible à la surface des capsides du parvovirus porcin et qu'il est fort probable que les mêmes résultats s'appliquent à ce virus (Zádori *et al.*, 2001).

**Figure 5 :** *Activité enzymatique de la PLA<sub>2</sub>*  
*Représentation schématique de l'activité enzymatique de la phospholipase A<sub>2</sub> sécrétée soit de catalyser l'hydrolyse d'une chaîne d'acides gras d'un phospholipide (lien ester sn-2) libérant un acide gras libre ainsi qu'une molécule de lysophospholipide.*

Phospholipide



#### 4.1.3. Implication du domaine unique à VP1 dans l'infection virale

Les analyses génétiques suggèrent que les peptides spécifiques à VP1, tandis qu'ils ne sont pas nécessaires pour la liaison du virus à la cellule, l'assemblage des particules, l'encapsidation du génome ou le relâchement des virions à partir de leur cellule hôte initiale, sont essentiels pour quelques étapes subséquentes au processus infectieux agissant à un moment non-identifié suivant l'internalisation du virus dans les cellules hôtes (Cotmore *et al.*, 1999; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002; Girod *et al.*, 2002). Plusieurs fonctions furent attribuées à la VP1 up comme une activité fixatrice d'ADN chez l'ADV et contenant des signaux de localisation nucléaire pour d'autres parvovirus (Zádori *et al.*, 2001). En effet, la région spécifique à VP1 chez le MVM contient des séquences candidates de reconnaissance karyophérine- $\alpha$  qui servirait de signal de localisation nucléaire en plus du domaine d'environ 40 acides aminés qui probablement exécute quelques fonctions biologiques critiques depuis qu'il est hautement conservé à travers les parvovirus (Cotmore *et al.*, 1999). Selon Vihinen-Ranta et ses collaborateurs (2002), le N-terminal de la VP1 comporte bel et bien un certain nombre de groupe d'acides aminés basiques qui ressemble aux séquences de localisation nucléaire classique incluant une séquence conservée près du N-terminal comprenant 4 acides aminés. Ce qui permettrait au peptide d'agir en tant que contrôleur du transport nucléaire des capsides suite à leur entrée dans le cytoplasme durant l'infection. L'examen de cette séquence fit en sorte de faire la constatation suivante soit qu'elle se situe dans la région qui est apparemment non requise pour l'activité PLA<sub>2</sub> de la région unique à VP1 (Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). Depuis que le peptide spécifique à VP1 comporte une telle séquence et fut démontré à servir d'intermédiaire dans la translocation de molécules VP1 nouvellement synthétisées jusqu'au noyau, il semble un candidat probable pour la circulation au niveau des vésicules même si, théoriquement, les virions MVM pourraient passer directement à travers les pores nucléaires sans désassemblage préalable vu leur petite taille (Cotmore *et al.*, 1999).

Des études réalisées sur l'AAV-2 suggèrent que l'activité de la pvPLA<sub>2</sub> soit requise à une étape du cycle viral suivant l'accumulation périnucléaire des virions mais avant l'expression des gènes précoces (Girod *et al.*, 2002). Selon les résultats obtenus par



Girod et ses collaborateurs (2002), les mutations effectuées dans la VP1 up n'ont aucunement affecté la réplication de l'ADN ni son encapsidation mais menaient à une forte réduction de l'infectivité du virus, réduction qui corrèle avec la perte de l'activité de la pvPLA<sub>2</sub>. De plus, la liaison du virus à la cellule ainsi que l'entrée à l'intérieur de cette entité ne furent pas affectées dans ces mutants (Girod *et al.*, 2002). Des études similaires furent effectuées avec le PPV où des mutations dans le centre catalytique de la pvPLA<sub>2</sub> n'avait aucun effet sur la liaison du virus, l'entrée ou la circulation jusqu'au compartiment endosomal/lysosomal tardif périnucléaire, tandis que les mutants échouaient par contre l'initiation de la réplication de l'ADN viral dans le noyau (Zádori *et al.*, 2001). Ces mutations de résidus aminés critiques dans la PLA<sub>2</sub> parvovirale putative du PPV ont donné comme résultat une forte réduction de l'activité PLA<sub>2</sub> et de l'infectivité du virus (Zádori *et al.*, 2001). Ces études effectuées sur l'AAV-2 ainsi que sur le PPV suggèrent donc que l'activité de la pvPLA<sub>2</sub> pourrait être requise pour la sortie du virus des endosomes tardifs et le transfère du génome viral à l'intérieur du noyau mais ni l'étape ni la fonction exacte de l'activité enzymatique durant le cycle viral du virus sont connues (Zádori *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2002). Davantage de caractérisation serait nécessaire afin de déterminer les événements moléculaires menant à l'activation de la pvPLA<sub>2</sub> aussi bien que la cible enzymatique.

Donc, la présence d'une activité enzymatique au niveau de la capsidie d'un virus retient l'attention puisque les capsides ont toujours eu leur importance au niveau de la protection du génome viral et au niveau de la liaison avec les récepteurs cellulaires. Les capsides semblent alors jouer un rôle beaucoup plus actif dans l'infection virale. La problématique demeure la suivante: comme aucune activité enzymatique n'est détectée pour les particules virales nouvellement synthétisées, la région unique de la VP1 n'est pas exposée à la surface du PPV. La PLA<sub>2</sub> en étant ainsi à l'intérieur de la particule virale n'a pas accès à son substrat, elle doit donc être externalisée. Un stimulus externe doit alors induire l'exposition des domaines spécifiques aux VP1 à la surface de la capsidie afin que l'enzyme puisse jouer son rôle.

# ***MÉTHODOLOGIE***

## 1. GÉNÉRALITÉS

Cette section regroupe les techniques communes utilisées fréquemment au cours de ce projet de maîtrise. Ces méthodes sont décrites en détail en premier lieu afin d'éviter qu'elles soient répétées au cours des sections suivantes.

### 1.1. Gels de polyacrylamide

Selon la méthode standard de Laemmli, la préparation d'un gel de polyacrylamide discontinu et sous des conditions dénaturantes afin de séparer des échantillons de protéine fut réalisée comme suit:

- Gel de séparation d'une concentration de 7.5%

3.75 ml de la solution d'acrylamide (30% [p/v] acrylamide, 0.8% [p/v] bisacrylamide) ont été mélangés à 3.75 ml de tampon 4X Tris •Cl/SDS pH 8.8 (1.5 M Tris-HCl, 0.4% [p/v] dodecyl sulfate de sodium [SDS], pH 8.8) et à 7.5 ml d'eau distillée (Ausubel *et al.*, 1994).

Ensuite, la solution fut dégazée sous vide (15 minutes) avant d'y ajouter 50  $\mu$ l d'une solution fraîche de persulfate d'ammonium 10% [p/v] en plus de 10  $\mu$ l de TEMED (Bio-Rad). Le gel de séparation ainsi préparé a été rapidement coulé dans le moule de l'appareil Mini-Protean ® II System de Bio-Rad (dimension 0.75 mm x 80 mm x 75 mm) jusqu'à une hauteur se situant en-dessous des puits du peigne utilisé. La surface du gel, avant sa polymérisation, fut recouverte immédiatement d'isobutanol 100% saturé d'eau afin d'obtenir une surface uniforme. Une fois le gel polymérisé soit après environ 30 minutes, le gel d'entassement fut préparé de la façon suivante:

- Gel d'entassement d'une concentration de 3.9%

650  $\mu$ l de la solution d'acrylamide (30% [p/v] acrylamide, 0.8% [p/v] bisacrylamide) ont été ajoutés à 1.25 ml de tampon 4X Tris •Cl/SDS pH 6.8 (0.5 M Tris-HCl, 0.4% [p/v] dodecyl sulfate de sodium [SDS], pH 6.8) et à 3.5 ml d'eau distillée (Ausubel *et al.*, 1994).

Suite au dégazement sous vide durant une quinzaine de minutes, 25  $\mu$ l de persulfate d'ammonium 10% [p/v] et 5  $\mu$ l de TEMED furent ajoutés au mélange. Le gel d'entassement a pu ensuite être coulé sur le gel de séparation une fois que l'interface de celui-ci fut rincé à l'eau distillée et que le peigne de dix puits de 5 mm de largeur y fut apposé. La polymérisation s'est poursuivie pendant une heure.

La préparation des échantillons ainsi que du marqueur de poids moléculaire (Broad Range, Bio-Rad) s'est effectuée comme suit où du tampon de chargement d'échantillons 5X (0.063 M Tris •Cl, 10% [v/v] glycérol, 2% [p/v] dodecyl sulfate de sodium, 5% [v/v] 2-mercaptoéthanol, 0.05 % [p/v] bromophénol bleu) a été ajouté pour une concentration finale de 1X (ex.: 1  $\mu$ l du marqueur de poids moléculaire, 3  $\mu$ l de tampon d'échantillons et 11  $\mu$ l d'eau distillée). Tous les échantillons en plus du marqueur furent bouillis dans l'eau pendant 10 minutes avant d'être chargés dans leur puits approprié. Le gel de polyacrylamide a été soumis à un courant de 200 volts et ce, pour environ 45 à 60 minutes dans une cuve contenant 400 ml de tampon d'électrophorèse/SDS (3% [p/v] Tris-base, 14.4% [p/v] glycine, 1% [p/v] dodecyl sulfate de sodium). Le temps de migration peut varier selon la taille suspectée des bandes ciblées mais aussi de la concentration du gel de séparation utilisée.

La visualisation des bandes sur le gel s'est effectuée dans un premier temps en incubant celui-ci dans une coloration de bleu de Coomassie (0.05% [p/v] bleu «Brilliant Blue R-250», 10% [v/v] acide acétique glacial, 50% [v/v] méthanol, 40% [v/v] eau distillée) durant 20 minutes et dans un deuxième temps, en incubant le gel dans une solution de décoloration (7% [v/v] acide acétique glacial, 5% [v/v] méthanol). La décoloration peut s'effectuer de 1 à 16 heures en changeant la solution au besoin. Il fut possible de conserver les gels soit en les déposant entre deux pellicules de Cellophane (Rose Scientific) imbibée d'une solution de séchage composée de 20% d'éthanol et 10% de glycérol et en incubant le tout entre deux plaques de plastique réservées à cet effet à 37°C toute la nuit.

L'alternative autre que la coloration afin de visualiser les bandes présentes sur le gel est le transfert du contenu du gel sur une membrane de nitrocellulose.

## 1.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

Le transfert des protéines du gel sur une membrane de nitrocellulose (0.2  $\mu\text{m}$ , Bio-Rad), préalablement trempée dans l'eau distillée, s'est effectuée à l'aide de l'appareil de transfert «The Panther<sup>TM</sup>», modèle HEP-1 de Owl Scientific. Sur la plaque de polarité négative de l'appareil, les composantes nécessaires au transfert furent empilées dans l'ordre qui suit, soit trois papiers absorbants (3 MM CHR de Whatman), le gel, la membrane de nitrocellulose, trois autres papiers absorbants et le couvercle de polarité positive. Tous ces éléments se doivent d'être imbibés de tampon de transfert (10 mM acide 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulfonique [CAPS], 10% [v/v] méthanol, pH 11) avant d'être déposés sur la plaque. Une fois les composantes mises en place, le transfert s'est effectué à 350 mA (Power supply, power pac 200, Bio-Rad) durant 60 minutes. Par la suite, la membrane peut être colorée au Ponceau S ou utilisée en immunobuvardage.

## 1.3. Gels d'agarose

Toutes manipulations impliquant l'ADN entraînent couramment une vérification des produits de réaction sur un gel d'agarose de 1%. Si une concentration autre que celle mentionnée est utilisée, le nouveau pourcentage sera alors spécifié. Le gel d'agarose a été obtenu en dissolvant 0.4 g d'agarose (Gibco BRL®) dans 40 ml de TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.114% [v/v] acide acétique glacial). La solution fut ensuite coulée dans un moule prévu à cet effet muni préalablement d'un peigne de 8 à 30 puits. Une fois le gel polymérisé, le tout fut placé dans un bain contenant le tampon TAE nécessaire pour faire circuler le courant à travers le gel. Pour le chargement, les échantillons d'ADN ont été mélangés 1:5 avec le tampon de chargement III 6X (0.25% [p/v] bleu de bromophénol, 0.25% [p/v] xylène cyanol FF, 30% [v/v] glycérol) et ensuite déposés dans les puits. Comme référence de taille, 1  $\mu\text{g}$  de marqueur de poids moléculaire 1 kb ou 100 bp (Gibco BRL®) fut utilisé. La migration s'est effectuée pendant une heure à 100 volts à l'aide d'un bloc d'alimentation de modèle 250/2.5 de Bio-Rad. Une fois la migration terminée, le gel a été coloré dans une solution de bromure d'éthidium de 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$

pendant une quinzaine de minutes. Le visionnement des bandes présentes sur le gel a été réalisé à l'aide d'une lampe à rayons ultra-violets et il fut possible de photographier le gel sur un film Polapan 667 de Polaroid. L'estimation de la taille des fragments d'ADN s'effectue par comparaison avec un marqueur d'ADN standard (1Kb ladder, Gibco BRL®).

#### **1.4. Culture cellulaire**

La lignée cellulaire PT soit de testicules de porc («Porcine Testis») fut utilisée au cours de ce projet lors de la production virale et des expérimentations en immunofluorescence.

La culture de ces cellules s'est effectuée dans un milieu «Dulbecco's Modified Eagle Medium» (DMEM, Gibco BRL®) complet soit enrichi de 1% [v/v] Pénicilline/Streptomycine (10 U/ $\mu$ l, Gibco BRL®), de 1 % [v/v] L-Glutamine 200 mM (Gibco BRL®), de 1% [v/v] solution d'acides aminés essentiels, MEM 10 mM (Gibco BRL®) et de 7% [v/v] sérum fœtal bovin inactivé (Gibco BRL®). Les cellules ont été incubées à 37°C en présence de CO<sub>2</sub> situé à 5%, soit les conditions normales de croissance.

Le passage des cellules s'est fait lorsque les feuillets cellulaires ont atteint une confluence de 100%. Les cellules adhérentes à la paroi du flacon (25, 75 ou 150 cm<sup>2</sup>, Corning®) furent lavées à l'aide de 10 ml de PBS (service de biotechnologie cellulaire, INRS-IAF) pour ensuite être décollées par une solution de trypsine TRL à 0.01% [p/v] (Worthington Biochemical) et d'EDTA 0.04% [p/v] (Gibco BRL®). Les cellules ont été mises en présence de 0.5 à 2 ml de cette solution (dépendant de la taille du flacon) durant environ 5 minutes en enlevant le surplus de trypsine. Par la suite, du milieu DMEM complet fut utilisé aussitôt afin de resuspendre les cellules dispersées et ainsi permettre l'utilisation de ces cellules pour des expérimentations ultérieures.

## **2. PURIFICATION DE VIRUS**

### **2.1. Production virale**

La production de virus s'est effectuée en ensemençant deux flacons de 150 cm<sup>2</sup> avec  $1.3 \times 10^7$  cellules dont le volume a été complété à 25 ml avec du milieu DMEM complet. Suite à l'obtention d'une confluence cellulaire d'environ 80% pour chacun des flacons, l'ajout du virus de souche NADL-2 (American Type Culture Collection, ATCC VR-742) a eu lieu pour une MOI de 1/500. Les cellules infectées furent maintenues en conditions normales de croissance et ce, jusqu'à ce que le feuillet cellulaire soit entièrement détruit par l'effet cytopathique du virus. Par la suite, il a été possible de conserver les cultures virales à 4°C en transvidant les milieux dans des bouteilles de verre pour ensuite procéder à la purification du virus.

### **2.2. Récolte du virus**

Les milieux contenant les débris cellulaires et les entités virales furent réparties dans des tubes à centrifuger de 250 ml (NALGENE®) avant d'être centrifugés 30 minutes à 11000 rpm. Comme la quantité de virus est négligeable dans le surnageant puisque la majorité des particules virales demeure liée aux débris cellulaires, ce sont les culots qui furent conservés suite à la centrifugation. Alors, les culots ont été resuspendus et mis en commun pour un volume final d'environ 1.5 ml dans du tampon 1X REACT® 2 (Invitrogen) où 10 mM MgCl<sub>2</sub> y furent ajoutés. Suite à une homogénéisation complète des culots, 50 µl de DNase I (10 U/µl, Boehringer Mannheim) furent ajoutés. La suspension a été incubée pendant une heure à 37°C. Une fois l'incubation terminée, la suspension a été séparée dans des tubes (Sarstedt) où 1/3 de volume d'une solution de trypsine 100TX2 (Worthington Biochemical) fut ajouté à chacun pour ensuite reprendre l'incubation durant 90 minutes à 37°C toujours. Du tampon Tris •Cl à pH 8.6 a été ajouté à tous les tubes pour une concentration finale de 200 mM. Après avoir mélangé et laissé les tubes au repos pendant 15 minutes à la température ambiante, les tubes ont été centrifugés trois minutes à une vitesse de 13000 g. Les surnageants furent cette fois-ci

récupérés pour ensuite leur ajouter 1/3 volume de chloroforme. Les suspensions ont été mélangées et centrifugées à nouveau à 13000 g durant 10 minutes. Par la suite, les phases aqueuses furent recueillies et mises en commun afin de procéder à la purification sur coussin de sucrose.

### 2.3. Purification sur coussin de sucrose

Les coussins de sucrose ont été préparés de la façon suivante, soit un premier contenant 10% de sucrose dans du tampon TE (10 mM Tris •Cl pH 7.8-8, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl) et un deuxième constitué de 5% de sucrose toujours dans le tampon TE. Les densités ainsi obtenues sont d'environ 1.04 g/cm<sup>3</sup> et 1.0197 g/cm<sup>3</sup>. Comme la densité des capsides virales est supérieure à 1.3 g/cm<sup>3</sup>, elles se retrouveront au fond du tube suite à la centrifugation. Alors, dans un tube à ultracentrifugation de 5 ml (Beckman), le premier coussin de 10% fut déposé à raison de 2.5 ml et 1 ml du deuxième coussin de 5% a été ajouté délicatement au-dessus du premier. La solution des phases aqueuses recueillie précédemment fut déposée sur le deuxième coussin pour ainsi obtenir un volume final de 5 ml. La centrifugation peut ainsi avoir lieu en utilisant un rotor Beckmann SW50.1 avec une ultracentrifugeuse Beckman L5-50 où le tube a été centrifugé à une vitesse de 40000 rpm pour 180 minutes. Une fois la centrifugation terminée, cinq fractions de 1 ml furent retirées du tube où la majorité des particules virales se situaient dans la dernière fraction au fond du tube et dans le culot obtenu. Le culot a été resuspendu avec la dernière fraction recueillie et filtré sur Microcon® Millipore YM-100 (100,000 MWCO, Micon Bioseparations) par centrifugation à 13000 g. Le filtre fut ensuite lavé à trois reprises avec du tampon TE en centrifugeant à 13000 g entre chacun des lavages. Au dernier lavage, lorsque le volume de tampon TE fut d'environ 200 µl au-dessus du filtre, celui-ci a été inversé sur un nouveau tube microcon et centrifugé à 13000 g pour 30 secondes.

Afin de vérifier la présence de virus et ainsi évaluer approximativement la concentration de la solution virale, l'échantillon a été analysé sur un gel de polyacrylamide de 7.5% (section 1.1).



### **3. EXPRESSION DE LA PARTIE UNIQUE DE LA PROTÉINE VP1**

#### **3.1. Système d'expression pBAD/TOPO thiofusion modifié**

Le système d'expression utilisé fut le pBAD/TOPO ThioFusion (Invitrogen) déjà modifié où un site de clonage multiple et deux sites de clivage à la protéase recombinante rTEV ont été ajoutés (modification du vecteur effectué par Marie-Claude Lacoste dans le cadre de sa maîtrise en 2000) (*Figure 6*).

#### **3.2. Clonage dans le vecteur pBAD modifié**

Le clonage de la partie unique de VP1 dans le vecteur pBAD fut réalisé par le docteur Zoltán Zádori du laboratoire du professeur Peter Tijssen (INRS-IAF) (Zádori *et al.*, 2001).

#### **3.3. Expression dans pBAD modifié**

##### **3.3.1. Induction avec l'arabinose**

À partir d'une colonie, 2 ml de milieu LB (1% [p/v] Bacto tryptone, 0.5% [p/v] extraits de levure, 1% [p/v] NaCl) contenant 100 µg/ml d'ampicilline (Roche Diagnostics) furent inoculés et incubés à 37°C pour 16 heures avec agitation à 250 rpm. Dans un Erlenmeyer de 1 litre, 500 ml de milieu LB avec ampicilline ont été inoculés avec 1 ml de la culture bactérienne obtenue précédemment. L'incubation s'est effectuée à 37°C avec agitation pendant deux heures. Par la suite, l'induction de la culture fut réalisée avec 2 ml d'une solution de 20% d'arabinose (L[+]-Arabinose, Sigma) pour une concentration finale de 0.08 %. La culture induite fut incubée à nouveau à 37°C avec agitation pendant environ trois heures et demie. Une fois l'incubation terminée, l'Erlenmeyer a été déposé sur la glace pour ensuite transvider son contenu dans des tubes à centrifugation refroidis de 250 ml (NALGENE®). La centrifugation de la culture s'est effectuée pendant 6 minutes à 6000 g. Les culots obtenus furent congelés à -20°C pour

ensuite être resuspendus dans du tampon de sonication (50 mM Tris •Cl pH 8.3, 300 mM NaCl) composé de 0.5% [v/v] Triton X-100 et d'inhibiteurs de protéase tels que 1/1000 pepstatin A (solution de 0.8 mg/ml) (Roche Diagnostics), 1/100 PMSF (solution de 10 mg/ml) (Gibco BRL Ultra Pure), 1/1000 E-64 (solution de 5 mg/ml) (Roche Diagnostics), 1/3000 leupeptine (solution de 3 mg/ml) (Roche Diagnostics), pour un volume final de 8 ml de tampon une fois les culots mis en commun et conservés sur glace.

### **3.3.2. Sonication des protéines**

La destruction des membranes cellulaires s'est effectuée à l'aide d'un sonicateur. Le tube contenant les culots fut mis en présence d'ultrasons pour une période de 20 secondes répétée dix fois où chacun des passages fut séparé par une attente de 30 secondes. La sonication s'est déroulée sur glace. Dès que les passages furent terminés, la solution de culots a été transférée dans un tube à centrifuger de 250 ml (NALGENE®). La centrifugation fut réalisée à 5000 g pour cinq minutes. Le surnageant fut conservé dans un tube de 15 ml (Sarstedt) sur glace.

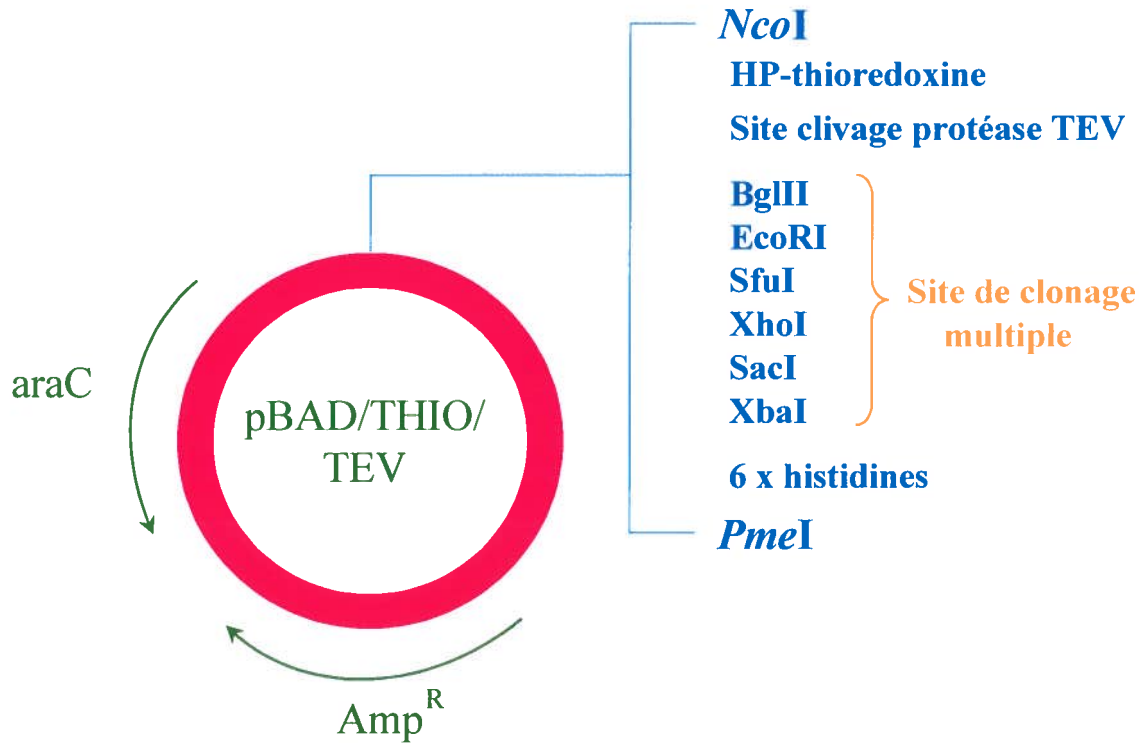
## **3.4. Purification des protéines de fusion**

### **3.4.1. Colonne de résine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (nickel)**

Pour la purification des protéines, 3ml de résine resuspendue furent déposés dans un tube de 15 ml (Sarstedt) et centrifugés une minute dans une centrifugeuse de table à vitesse maximale. Le surnageant fut enlevé et 5 ml de tampon de sonication avec inhibiteurs ont été ajoutés pour ensuite être recentrifugés à nouveau une minute. Le surnageant a été enlevé, 1.5 ml de tampon de sonication avec inhibiteurs furent ajoutés et le tout a été centrifugé une minute. Après cette centrifugation, la résine fut resuspendue et le surnageant de protéines obtenu précédemment a été transféré dans le tube contenant la résine. Le mélange fut incubé à l'horizontale à 4°C pendant une heure sous agitation. La résine fut centrifugée une minute à vitesse maximale dans une centrifugeuse de table et le

surnageant fut enlevé. Le mélange de résine-protéines a alors été lavé deux fois avec 7 ml de tampon de sonication en éliminant entre chaque lavage le surnageant après les centrifugations. Par la suite, 15 mM d'imidazole furent ajoutés au tampon de sonication contenant déjà les inhibiteurs ainsi que le Triton X-100. Un autre lavage fut effectué avec ce tampon de sonication et après la centrifugation la résine fut resuspendue délicatement avec le surnageant contenu dans le tube. Ceci servit à remplir la colonne de purification qui est formée d'une seringue constituée d'un robinet où le débit fut réglé à environ une goutte par seconde. La résine chargée de protéines fut donc déposée dans la colonne pour ensuite être lavée trois fois avec 10 ml de tampon de sonication de 15 mM d'imidazole. Un autre lavage a été réalisé cette fois-ci avec 7 ml de tampon de sonication constitué de 25 mM d'imidazole c'est-à-dire que 10 mM d'imidazole furent ajoutés au tampon de sonication contenant déjà 15 mM d'imidazole. Suite à ce dernier lavage, l'élution des protéines a pu avoir lieu avec du tampon de sonication (50 mM Tris •Cl pH 8.3, 300 mM NaCl) composé seulement de 250 mM d'imidazole. Trois échantillons d'éluats furent recueillis soit avec un premier volume de 500  $\mu$ l de la solution d'élution, avec un deuxième et un troisième volume de 2 ml de solution d'élution. Chacun des échantillons fut vérifié sur un gel de polyacrylamide d'une concentration de 15 %.

**Figure 6 :** *Système d'expression pBAD/TOPO thiofusion*  
*Représentation de la carte du vecteur pBAD/Thio modifié*  
*comportant le nouveau site de clonage multiple ainsi que les deux*  
*nouveaux sites de clivage à la protéase recombinante rTEV sont*  
*présents.*



### 3.4.2. Dialyse des protéines

La dialyse s'est effectuée avec des membranes cylindriques munies de pores (Spectra/Por®) laissant passer les particules de taille inférieure à 12-14 000 kDa (MWCO 12-14,000). La membrane fut placée dans un bécher rempli d'eau bouillante pendant cinq minutes pour être ensuite remplie de 1ml de chacun des deux échantillons appropriés de protéine pour un volume total de 2 ml. La dialyse fut réalisée contre un litre de 50 mM Tris •Cl pH 8.3 et de 200 mM NaCl avec agitation durant deux à trois heures à 4°C.

### 3.5. Clivage avec la protéase rTEV

Les protéines dialysées furent soumises à une digestion par la protéase recombinante rTEV (Tobacco Etch Virus) afin d'éliminer la thioredoxine et la queue d'histidines. Pour procéder au clivage, il a fallu prendre 350 unités de rTEV pour les 2 ml de protéines (1 mg/ml) à raison d'une unité de rTEV clive environ 3 µg de protéines en une heure. Donc, pour 2 ml de protéines, 35 µl de rTEV (10 U/µl, Gibco BRL®) et une concentration finale de DTT de 0.5 mM furent ajoutés et la réaction s'est effectuée pendant environ deux heures à la température ambiante. Suite à l'incubation, la digestion fut aussi vérifiée sur un gel de polyacrylamide de 15%.

### 3.6. Purification sur colonne échangeuse d'ions

Pour ce faire, un gradient de sel pour un volume de 3 ml de concentration 0.1 M à 0.6 M de NaCl fut préparé avec du tampon 50 mM Tris •Cl pH 8.3, 2 M NaCl et ce, dans des tubes de 15 ml (Sarstedt). Ensuite, l'échantillon de protéines digérées fut dilué 7.5X dans du tampon 50 mM Tris •Cl pH 8.3. De plus, le point isoélectrique de la partie unique de VP1 étant de 9.47 soit de charge positive, la colonne échangeuse d'ions utilisée fut la S15 de Sartorius Corporation, c'est-à-dire une colonne cationique (acide sulfonique R-CH<sub>2</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Une seringue de 5 ml (Syringe 5cc Luer Lok®) a été remplie de l'échantillon de protéines dilué pour ensuite être connectée à la colonne S15. Le passage

de l'échantillon dans la colonne s'est effectué en évitant la présence de bulles. Une petite quantité d'échantillon passé fut recueillie et conservée pour fin d'analyse sur gel. La colonne fut par la suite lavée deux fois avec 50 mM Tris •Cl pH 8.3 soit deux fois le volume de la seringue. Suite à ces lavages, le passage du gradient de sel de concentration croissante a pu avoir lieu tout en recueillant la solution après chacun des passages dans des tubes de 15 ml (Sarstedt). La densité optique fut alors prise à 280 nm sur un spectrophotomètre (GeneQuant, Pharmacia Biotech) pour chacun des échantillons obtenus afin de déterminer l'échantillon contenant les protéines désirées. Ensuite, tous les échantillons conservés lors de cette expérimentation furent analysés sur un gel de polyacrylamide 15% afin de vérifier si les protéines d'intérêts sont bel et bien dans l'échantillon désigné auparavant par spectrophotométrie.

#### **4. AFFICHAGE DE PHAGES («PHAGE DISPLAY»)**

L'utilisation de banques peptidiques permet la sélection de peptides présentant une haute affinité envers une molécule-cible et de plus, il est possible de connaître par séquençage l'identité des séquences peptidiques de haute affinité.

##### **4.1. Librairie peptidique**

La librairie phagique utilisée fut une construction de séquences peptidiques aléatoires présentée à la surface de la protéine pIII du bactériophage M13 qui est présente en cinq copies. Cette librairie peptidique était Ph.D.-7<sup>TM</sup> ( $2 \times 10^9$  clones) de New England Biolabs.

## 4.2. Sélection par affinité

### 4.2.1. Méthodologie de sélection

La technique du «phage display» permet une identification rapide des ligands peptidiques pour une variété de molécules-cibles par sélection par affinité («biopanning»). La méthodologie de base utilisée pour cette procédure était celle fournie par la compagnie New England Biolabs.

Dans un premier temps, un puits d'une microplaque (modèle Linbro®/Titertek®, 96 puits) a été enrobé avec des protéines VP1 up obtenues à la section 3.6. 100 µg/ml de protéines dans 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6 ont été utilisés pour chaque ronde de sélection suivi d'une incubation à 4°C pour la nuit. Par la suite, les espaces libres du puits furent saturés avec une solution de blocage composée de 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6 et 5 mg/ml de BSA pendant une heure à 37°C. Après six lavages du puits avec une solution de TBST (50 mM Tris •Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% [v/v] Tween-20), 2x10<sup>11</sup> phages provenant de la librairie Ph.D.-7<sup>TM</sup> dans 100 µl TBST furent ajoutés au puits pour ensuite être incubés une heure sous agitation douce à la température ambiante. Le puits a été lavé à dix reprises avec du TBST afin d'enlever les phages non-liés. L'élution des phages liés aux protéines s'est effectuée à l'aide de 100 µl d'un tampon d'élution constitué de 0.2 M de glycine-HCl pH 2.2 et 1 mg/ml de BSA. Les phages élués ont ensuite été neutralisés avec 15 µl d'une solution 1 M Tris •Cl pH 8.6. L'éluat fut ajouté à une culture de bactéries ER2537 en phase log précoce de croissance contenant 300 µl de bactéries et 700 µl de milieu LB et le tout fut incubé à 37°C durant 30 minutes. Cette culture fut ensuite ajoutée à 25 ml de milieu LB et l'incubation fut de cinq heures à 37°C sous agitation vigoureuse. La culture finale fut centrifugée dix minutes dans une centrifugeuse Sorvall à 10000 rpm à 4°C. Du surnageant, 80% [v/v] ont été ajoutés à 1/6 volume de PEG/NaCl (20% [p/v] polyéthylène-glycol-8000, 2.5 M NaCl). La précipitation s'est effectuée toute la nuit à 4°C.



#### **4.2.2. Enrichissement en phages spécifiques**

Une fois les phages élués et précipités, une centrifugation fut effectuée à nouveau pendant 15 minutes à 10000 rpm à 4°C. Le culot de phages obtenu a été resuspendu dans 300  $\mu$ l de TBST et transféré dans un tube (Sarstedt). Cette fraction d'éluat amplifiée fut titrée tel que décrit dans la section 4.2.3 pour ensuite être utilisée directement, sans dilution subséquente dans du TBST, pour une seconde ronde d'amplification sous les mêmes conditions qu'à la section 4.2.1. Suite à la seconde ronde, la nouvelle fraction d'éluat obtenue fut utilisée à nouveau pour une troisième ronde d'amplification.

#### **4.2.3. Titrage des phages**

La détermination du titre phagique s'est effectuée à chacune des rondes de sélection. Des dilutions sérielles de la suspension de phages à titrer fut réalisées dans du milieu LB où 10  $\mu$ l de ces dilutions ont été utilisés pour infecter 200  $\mu$ l d'une culture de bactéries ER2537 à une  $DO_{600}$  de 0.5. Chacune des cultures infectées furent ajoutées à un tube en verre stérile de 12 ml (Fisher Scientific) contenant 2 ml de LB TOP-Agar (LB-Agar: 1% [p/v] de Bacto-Tryptone, 0.5% [p/v] d'extraits de levure, 1% [p/v] NaCl, 1.5% [p/v] Bacto-Agar), soit 1:1 de milieu LB et de milieu LB-Agar, préalablement chauffé à 45°C. Les solutions d'agar contenant les phages et les bactéries ont été étalées soigneusement sur des géloses de LB-agar pour ensuite être incubées en position inversée toute la nuit à 37°C. Le compte des plages de lyse a pu par la suite avoir lieu pour chacune des dilutions de phage.

### **4.3. Spécificité des phages sélectionnés**

#### **4.3.1. Production phagique**

Suite à la troisième ronde de sélection, dix plages de lyse différentes obtenues lors du titrage des phages furentensemencées chacune dans un tube en verre stérile de 12 ml (Fisher Scientific) contenant 2 ml de milieu LB. Les tubes furent incubés à 37°C sous agitation vigoureuse pendant un minimum de cinq heures. Chacun des tubes fut numéroté de 1 à 10. Après l'incubation, la culture de chaque tube fut transférée dans des tubes de 2 ml (Sarstedt) pour ensuite être centrifugée cinq minutes à 10000 rpm dans une centrifugeuse de table. Du surnageant, 60% [v/v] furent ajoutés à 1/6 volume de PEG/NaCl (20% [p/v] polyéthylène-glycol-8000, 2.5 M NaCl) contenu dans d'autres tubes. La précipitation s'est effectuée toute la nuit à 4°C. Les surnageants restants furent conservés à 4°C pour les expérimentations de mesure de la spécificité. Une fois la précipitation terminée, une centrifugation fut effectuée à nouveau pendant cinq minutes à 15000 rpm. Les surnageants furent enlevés complètement tout en conservant que les culots qui furent resuspendus à l'aide d'une solution de 1% [p/v] SDS, 5 mM EDTA et 300 µg/ml de protéinase K et tous les tubes furent déposés dans un bain réglé à 55°C durant 30 minutes pour permettre une éventuelle purification de l'ADN phagique.

#### **4.3.2. Mesure de la spécificité par ELISA**

La spécificité des phages sélectionnés fut vérifiée par un test ELISA où une concentration de 100 µg/ml de protéines VP1 up (section 3.6) et de protéines de fusion (section 3.4.2), comportant la partie unique de VP1, préparée dans 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6 fut adsorbée dans des puits d'un microplateau (modèle Linbro®/Titertek®, 96 puits) pendant toute une nuit à 4°C. Par la suite, les espaces libres de chacun des puits furent saturés à l'aide de 200 µl d'une solution de blocage composée de 5 mg/ml de BSA et 0.1 M de NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6. L'incubation s'est effectuée à 37°C pour une heure. Après que les puits furent lavés à six reprises avec 200 µl de TBST, des dilutions des surnageants de phage obtenus à la section 4.3.1 (# 1 à 10) furent réalisées dans du TBST pour un titre

d'environ  $10^{11}$  phages/ml et ajoutées aux puits appropriés et ce, en duplicata (100  $\mu$ l). Le témoin négatif utilisé fut une dilution d'un surnageant du phage sauvage M13 pour un même titre. L'incubation s'est déroulée sous agitation à la température de la pièce pendant une heure. Les puits furent lavés cinq fois avec du TBST avant d'être mis en présence de 100  $\mu$ l de l'anticorps monoclonal de souris anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech) à une dilution de 1/5000 dans du TBST. Après l'incubation d'une heure à la température ambiante, les puits furent à nouveau lavés deux fois avec du TBST et 100  $\mu$ l du deuxième anticorps furent ajoutés à tous les puits. L'anticorps secondaire utilisé fut un anticorps anti-IgG de souris conjugué à la phosphatase alcaline (Goat Anti-Mouse IgG [H+L]-AP conjugate, Bio-Rad) dilué 1/500 dans le TBST. Suite à l'incubation d'une heure à la température de la pièce, les puits ont été lavés à trois reprises avec du TBST et une fois avec 100  $\mu$ l de tampon PNPP (25  $\mu$ l diéthanolamine 100% (Sigma), 25  $\mu$ l  $MgSO_4$  1 M, pH 9.5 dans 25 ml d'eau distillée). La détection colorimétrique s'est effectuée à l'aide du substrat *p*-nitrophenyl phosphate (Roche Diagnostics) soit 50  $\mu$ l d'une solution de substrat PNPP (0.010 g 4-nitrophenyl phosphate dans 10 ml tampon PNPP) ajoutés dans chacun des puits pour une incubation d'une durée de 15 à 30 minutes à l'obscurité et ce, à la température ambiante. La réaction fut arrêtée avec 50  $\mu$ l d'une solution EDTA 0.1 M, pH 8 et la densité optique a été mesurée à une longueur d'ondes de 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à faisceaux verticaux (Dynatec).

#### 4.3.3. Extraction de l'ADN phagique

Après l'incubation décrite à la section précédente, 100  $\mu$ l de phénol furent ajoutés à tous les tubes pour ensuite être mélangés avant d'être centrifugés cinq minutes à 12800 rpm dans une centrifugeuse de table. Chacune des phases aqueuses fut transférée dans d'autres tubes où 100  $\mu$ l d'une solution de phénol/chloroforme (rapport 1:1) furent ajoutés. Les tubes furent à nouveau centrifugés cinq minutes à 12800 rpm après avoir mélangé le contenu de chacun des tubes. Les phases aqueuses ont été transférées dans d'autres tubes où 50  $\mu$ l de la solution de phénol/chloroforme furent ajoutés et par la suite centrifugés comme précédemment. À partir des phases aqueuses ainsi obtenues, une

précipitation à l'acétate d'ammonium fut effectuée où 0.2 volume de 10 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$  fut ajouté aux phases aqueuses ainsi qu'un volume total d'isopropanol 100% (ratio 1:1 soit un volume phase aqueuse +  $\text{NH}_4\text{Ac}$  pour un volume isopropanol). Les tubes furent laissés à la température ambiante pendant dix minutes après les avoir bien mélangés. Ensuite, ils furent centrifugés cinq minutes à 15000 rpm, les surnageants furent retirés et les culots ont été lavés à deux reprises avec 500  $\mu\text{l}$  d'éthanol 70% où entre chacun des lavages, une centrifugation fut effectuée cinq minutes à 15000 rpm. Après le second lavage, les culots conservés furent séchés au Speed Vac (Savant) pour environ dix minutes. Ils ont par la suite été resuspendus dans 15  $\mu\text{l}$  d'eau distillée. Pour chacune des suspensions, la densité optique fut mesurée à 260 nm et 280 nm en spectrophotométrie afin de déterminer la concentration d'ADN phagique en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  contenue dans chacun des tubes.

#### 4.3.4. Séquençage

Selon la concentration d'ADN phagique, les tubes numérotés # 3, 4, 5, 6, 7, 8 et 10 furent donnés pour fin de séquençage. Les séquences d'ADN pour ces phages furent obtenues à l'aide de l'amorce-28gIII (5' GTATGGGATTTTGCTAAACAAC 3', New England Biolabs) situé en aval de la séquence codante pour les différents peptides exposés en surface de phage entre les sites enzymatiques *KpnI* et *Eag I*. Le séquençage fut réalisé par le service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier avec le système ABI Prism (310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer).

## 5. PROTÉINES PHAGIQUES

### 5.1. Synthèse des oligonucléotides

Suite au séquençage des ADN phagiques, quatre phages furent sélectionnés soit # 6, 7, 8 et 10, et un autre séquençage fut effectué pour l'ADN de ces phages avec l'amorce-96gIII (5' CCCTCATAGTTAGCGTAACG 3', New England Biolabs). Par la suite, leurs séquences en 5' et 3' ont été synthétisées au service de synthèse d'oligonucléotides de l'INRS-Institut Armand-Frappier en leur ajoutant les sites de restriction de *Bgl* II et de *EcoR* I (Tableau II).

### 5.2. Clonage dans le système pBAD/TOPO thiofusion modifié

#### 5.2.1. Digestion et précipitation du plasmide pBAD modifié

La digestion du plasmide pBAD/TOPO thiofusion modifié fut réalisée en utilisant 4  $\mu$ l d'ADN plasmidique, 2  $\mu$ l d'enzymes *Bgl* II (8 U/ $\mu$ l, Pharmacia Biotech), 8  $\mu$ l de tampon de digestion One-Phor-All 10X (Pharmacia Biotech) ainsi que 26  $\mu$ l d'eau distillée pour un volume final de réaction de 40  $\mu$ l qui fut incubé pendant deux heures à 37°C. La digestion fut ensuite vérifiée sur un gel d'agarose où 4  $\mu$ l d'échantillon ont été utilisés. Par la suite, 6  $\mu$ l de tampon de digestion One-Phor-All 10X, 3  $\mu$ l d'enzymes de restriction *EcoR* I (10 U/ $\mu$ l, Invitrogen) et 21  $\mu$ l d'eau distillée furent ajoutés à la première digestion. L'incubation s'est poursuivie un autre deux heures à 37°C.

Une fois la digestion terminée, il était possible de procéder à une précipitation de l'ADN à l'acétate d'ammonium. Alors, 0.2 volume de 10 M NH<sub>4</sub>Ac a été ajouté à l'échantillon de plasmides digérés ainsi qu'un volume total d'isopropanol 100%. Le tout a été mélangé et laissé cinq minutes à la température ambiante pour ensuite être centrifugé à 18000 g pendant cinq minutes. Le surnageant fut retiré et 200  $\mu$ l d'éthanol 70% ont été ajoutés au culot. Une autre centrifugation s'est effectuée à 18000 g durant cinq minutes. Le surnageant fut encore enlevé et le tube contenant le culot fut déposé au Speed Vac pour une durée de dix minutes. Le culot séché fut resuspendu avec 30  $\mu$ l d'eau distillée et la purification fut vérifiée sur un gel d'agarose.

**Tableau II :** *Oligonucléotides synthétisés*  
*Séquences en 5' et 3' obtenues suite au séquençage de l'ADN*  
*phagique des quatre phages sélectionnés servant à la synthèse des*  
*oligonucléotides.*

Phages	Oligonucléotides synthétisés
# 6	<b>Brin en 5':</b> <b>5'GATCGGTGAATCAGTCTTATACTTCGACTTGGTTTTGGGCTG3'</b> <b>Brin en 3':</b> <b>5'AATTCAGCCCAAACCAAGTCGAAGTATAAGACTGATTCACC3'</b>
# 7	<b>Brin en 5':</b> <b>5'GATCGTGGTCTAGTTCGCATTATCCTCCGCATTGGACTGCGG3'</b> <b>Brin en 3':</b> <b>5'AATTCCGCAGTCCAATGCGGAGGATAATGCGAACTAGACCAC3'</b>
# 8	<b>Brin en 5':</b> <b>5'GATCGTGGCCTCAGTTGTTTACTTTCCGTGTTGTAATCCTG3'</b> <b>Brin en 3':</b> <b>5'AATTCAGGATTACAACACGGAAAAGTAAACAACTGAGGCCAC3'</b>
# 10	<b>Brin en 5':</b> <b>5'GATCGGGTCTGAAGATTTGGAGTTTGCCGCCGCATCATGGGG3'</b> <b>Brin en 3':</b> <b>5'AATTCCCATGATGCGGCGGCAAACTCCAAATCTTCAGACCC3'</b>

### 5.2.2. Appariement des brins

Suite à l'obtention des oligonucléotides synthétisés, il fut possible de procéder à l'appariement des brins 5' et 3' synthétisés pour chacun des quatre phages. Alors, 800 pmol du brin 5' de même que 800 pmol du brin 3' d'un phage donné furent ajoutés au tampon de ligation 1X (tampon T4 DNA ligase 5X, Gibco BRL®) pour un volume total de 20  $\mu$ l complété avec de l'eau distillée. Une fois les composantes mises en commun pour chacun des phages, les quatre échantillons furent placés dans un bain d'une température de 80°C pendant une minute pour ensuite éteindre le chauffe-eau afin que la température diminue jusqu'à 45°C tout en y laissant les tubes. Une centrifugation des échantillons de quelques secondes a finalement été effectuée afin de faire descendre toute condensation présente sur les parois des tubes.

### 5.2.3. Ligation dans pBAD modifié

Dans quatre autres tubes, il fut ajouté dans chacun d'eux 6  $\mu$ l d'échantillon approprié obtenu précédemment (section 5.2.2), 3  $\mu$ l de pBAD digérés (section 5.2.1), 1  $\mu$ l du tampon de ligation (tampon T4 DNA ligase 5X, Gibco BRL®) et 1  $\mu$ l d'enzyme ligase (1 U/ $\mu$ l, T4 DNA ligase, Gibco BRL®). L'incubation s'est effectuée à la température ambiante pendant 30 à 60 minutes.

### 5.2.4. Transformation par électroporation

Les réactions d'électroporation se sont préparées sur glace où des cuvettes stériles (BTX Disposable Cuvettes, 1 mm) furent conservées à 4°C pour un minimum d'une minute. Dans un tube de 1.5 ml (Sarstedt) contenant 45  $\mu$ l de cellules électrocompétentes BL21 (section 5.2.4.1), 1.5  $\mu$ L de produit de ligation furent ajoutés puis le tout bien mélangé a été transféré dans une des cuvettes stériles. Une fois la cuvette placée dans le support approprié de l'appareil, l'électroporateur (BTX ECM® 395 Electroporation System) fut ajusté à 1.5 kVolts pour 5 msecondes pour ensuite enclencher le choc. Le



contenu de la cuvette a été aussitôt étalé sur une gélose LB-agar contenant de l'ampicilline, antibiotique nécessaire à la sélection, et incubée en position inversée à 37°C pendant environ 16 heures. La même démarche fut réalisée pour chacun des produits de ligation.

#### **5.2.4.1. Production de cellules compétentes**

La production de bactéries compétentes s'est effectuée à l'aide d'un tube contenant 100  $\mu$ l de cellules compétentes BL21 (Stratagene) dont le contenu fut ajouté à 700 ml de milieu LB et à 700  $\mu$ l de chloramphénicol (25 mg/ml). L'incubation s'est déroulée sous agitation vigoureuse à 32°C jusqu'à l'obtention d'une densité optique située entre 0.5 et 1 à 600 nm, soit de 3 à 6 heures. Une fois la densité optique atteinte, la culture fut transférée dans des tubes à centrifugation de 250 ml stériles (NALGENE®) pour ensuite être déposés sur glace. La centrifugation s'est réalisée à une vitesse de 6000 g à 4°C et ce, pour cinq minutes dans une centrifugeuse Sorvall. Les surnageants furent rejetés et les culots ont été resuspendus au vortex et mis en commun dans un seul tube à l'aide de 50 ml d'eau stérile d'une température de 4°C. Le tube conservé sur glace contenant les culots a été rempli d'eau stérile à 4°C à raison d'un volume final de 250 ml pour ensuite être centrifugé à 6000 g pendant cinq minutes et ce, à 4°C. Le surnageant a été à nouveau enlevé, le culot fut resuspendu au vortex avant d'y ajouter 200 ml d'eau stérile à 4°C et centrifugé une dernière fois comme précédemment. Le culot obtenu fut resuspendu au vortex et l'ajout de 2.5 ml de glycérol 10% stérile à 4°C eu lieu. Des tubes de 1.5 ml (Sarstedt) placés sur la glace furent remplis avec 80  $\mu$ l de cellules compétentes pour ensuite être conservés à -70°C. Il fut possible de vérifier l'efficacité de ces cellules en effectuant une électroporation à l'aide du plasmide pBAD modifié non-digéré.

## 5.2.5. Sélection des clones positifs

### 5.2.5.1. Mini-préparation rapide d'ADN

La méthode utilisée est une modification du protocole de Cormack et Somshich (1997). Cette méthode de UFX («ultra-fast alkaline lysis plasmid extraction») permet de faire une sélection rapide des clones qui est basée sur le patron de digestion de l'ADN par une enzyme de restriction quelconque et ainsi de vérifier si l'insert d'intérêt est bel et bien présent dans le plasmide.

Pour ce faire, 12 colonies obtenues de chacune des transformations précédentes ont étéensemencées individuellement dans 2 ml de milieu LB avec ampicilline contenus dans des tubes de verre stériles (Fisher Scientific). Après une incubation de 16 heures à 37°C avec agitation de 250 rpm, 200 µl de chacune des cultures furent transférés dans des tubes de 1.5 ml auxquels ont été ajoutés 200 µl de solution de lyse (1% [p/v] SDS, 0.2 N NaOH). Après avoir mélangé délicatement par inversion chacun des tubes, la réaction de lyse fut arrêtée par l'ajout de 250 µl de solution de neutralisation (3 M d'acétate de potassium, pH 5.5). Les tubes furent mélangés délicatement à nouveau par inversion avant d'être laissés sur glace pour cinq minutes et être centrifugés à 21000 g pendant deux minutes. Les surnageants ont été transférés dans d'autres tubes où 500 µl d'isopropanol 100% furent ajoutés. Le contenu des tubes a été mélangé avant d'être centrifugé à 21000 g pendant une minute. Après avoir enlevé les surnageants, les culots ont été séchés au Speed Vac durant dix minutes pour ensuite être resuspendus dans 40 µl d'eau distillée contenant 10 µg/ml de RNase A (Pharmacia Biotech).

Pour effectuer la digestion de 12 clones d'un phage, une solution stock de digestion pour 13 clones fut préparée soit une première solution avec l'enzyme de restriction *EcoR* I et une deuxième avec l'enzyme *Bgl* II. Pour ce faire, 3.9 µl de l'enzyme approprié, 26 µl de tampon de digestion One-Phor-All 10X et 152.1 µl d'eau distillée furent mélangés dans un tube de 1.5 ml (Sarstedt). Ensuite, chacun des mélanges d'enzyme fut aliquoté dans 12 tubes de 1.5 ml (Sarstedt), soit 14 µl par tube, et 6 µl de l'ADN obtenu précédemment ont été ajoutés à chacun des tubes puis mélangés. Le total d'échantillons obtenus fut de 24 tubes soit 12 tubes contenant l'enzyme *EcoR* I et 12

autres contenant l'enzyme *Bgl* II et ce, pour chacun des quatre phages. Toutes les réactions furent incubées une heure à 37°C. Par la suite, le patron de digestion a été vérifié sur gel d'agarose avec comme contrôle des échantillons non-digérés. Un clone positif pour chacun des phages fut sélectionné et repiqué dans 2 ml de milieu LB avec ampicilline dans le but de faire une mini-préparation d'ADN suivant le protocole de «Plasmid Mini Kit» de Qiagen en vue du séquençage. Comme cette procédure est uniquement une méthode de sélection préliminaire, le séquençage est de mise afin de s'assurer que les échantillons choisis sont de vrais positifs.

#### **5.2.5.2. Séquençage**

Les clones choisis furent séquencés par le service de séquençage de l'INRS-Institut Armand-Frappier avec le séquenceur automatique (ABI Prism, 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer). L'amorce utilisée pour le séquençage du vecteur pBAD comprenant l'insert fut le TRX Forward (5' TTCCTCGACGCTAACCTG 3', Invitrogen).

### **5.3. Expression dans pBAD modifié**

Lorsque les séquences furent identifiées et révélées exactes, chacun des clones positifs choisis fut repiqué à nouveau dans 2 ml de milieu LB avec ampicilline et mis à 37°C sous agitation pour 16 heures. À partir de 1 ml de ces cultures, 250 ml de milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline toujours ont été inoculés individuellement et incubés à 37°C avec agitation et ce, pour environ deux heures. L'induction des cultures ainsi que la sonication des protéines se sont effectuées comme décrit dans les sections 3.3.1 et 3.3.2.

#### 5.4. Purification des protéines induites

La purification s'est réalisée par chromatographie à l'aide d'une colonne de résine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose. La préparation de cette résine s'est effectuée comme suit où 4 ml de résine resuspendue furent déposés dans un tube de 15 ml (Sarstedt) et centrifugés une minute à vitesse maximale dans une centrifugeuse de table. Le surnageant a été retiré et 5 ml de tampon de sonication contenant les inhibiteurs de protéase (section 3.4.1) et 10 mM d'imidazole ont été ajoutés pour ensuite être recentrifugés une minute. Le surnageant fut enlevé à nouveau, 2 ml du même tampon de sonication ont été ajoutés et le tout fut centrifugé une autre minute. Suite à cette centrifugation, la résine fut resuspendue avec le surnageant et séparée en deux soit 2 ml de résine dans un tube et 2 ml dans un autre tube de 15 ml (Sarstedt). Cette procédure fut répétée une autre fois afin d'obtenir deux autres tubes de résine puisque quatre échantillons différents de protéine devaient être purifiés. Chacune des résines fut chargée d'un surnageant protéique obtenu précédemment suite à la sonication et incubée à l'horizontale sur de la glace sous agitation pendant une heure. Les tubes furent à nouveau centrifugés une minute à vitesse maximale et les surnageants ont été enlevés. Les mélanges de résine-protéine furent ensuite lavés à trois reprises avec 7 ml de tampon de sonication avec inhibiteurs où de l'imidazole fut ajouté au 10 mM déjà contenu dans le tampon jusqu'à l'obtention d'une concentration finale de 30 mM. Entre chacun des lavages, la résine et le tampon furent mélangés et centrifugés une minute en éliminant à chaque fois le surnageant. Au troisième lavage, suite à la centrifugation, le surnageant fut conservé dans le tube afin de resuspendre délicatement la résine. Chacune des résines ainsi resuspendues a été transférée dans une colonne de purification formée d'une seringue constituée d'un robinet. Les colonnes comportant les résines furent lavées trois fois avec 10 ml de tampon de sonication avec inhibiteurs et 30 mM d'imidazole. L'élution des protéines s'est effectuée à l'aide du tampon de sonication constitué seulement de 250 mM d'imidazole. Trois éluats furent recueillis pour chacun des échantillons soit avec un premier volume de 500  $\mu$ l de la solution d'élution, un deuxième volume de 2 ml et un troisième volume de 1.5 ml de la solution d'élution. Chacun de ces échantillons fut vérifié sur un gel de polyacrylamide d'une concentration de 15%.

## **6. ANTICORPS MONOCLONAUX ET POLYCLONAUX**

### **6.1. Anticorps monoclonal 3C9**

Cet anticorps est issu du surnageant de culture de l'hybridome 3C9-D11-H11 (ATCC, CRL-1745) reconnaissant la région C-terminale de la protéine VP1 up et le domaine N-terminale de la VP2 du PPV.

### **6.2. Sérum # 416 VP1 up**

La préparation de l'antigène VP1 pour fin d'immunisation fut effectuée par le Dr. Zoltán Zádori. La production de l'anti-sérum polyclonal, spécifique à l'antigène VP1 unique, dans le lapin fut réalisée par le service d'animalerie de l'INRS-Institut Armand-Frappier.

### **6.3. Sérum # 414 SAT**

Ce sérum fut élaboré comme décrit à la section 6.2. L'antigène utilisé fut une protéine nommée SAT, qui n'a aucune homologie avec les protéines VP connues, récemment découverte chez le PPV.

## **7. TEST ELISA**

L'antigène d'intérêt a été dilué dans 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6 et déposé dans les puits d'une microplaque (Linbro®/Titertek®, 96 puits). Suite à l'adsorption de l'antigène pendant une nuit à 4°C, le plateau a été vidangé et les sites non spécifiques ont été bloqués en ajoutant 200 µl d'une solution de blocage (5 mg/ml BSA, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6) à chacun des puits et la microplaque fut incubée à 37°C pendant une heure. Ensuite, la solution de blocage fut enlevée et les puits ont été lavés deux fois avec 200 µl de TBST (50 mM Tris •Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% [v/v] Tween-20). Par la suite, 100 µl de

phages ou de protéines phagiques préparés dans du TBST furent ajoutés aux puits appropriés et une incubation s'est effectuée sous agitation pour une période d'une heure à la température ambiante. Les puits ont été à nouveau lavés à cinq reprises avec 200  $\mu$ l de TBST. Suite à ces lavages, 100  $\mu$ l du premier anticorps approprié dilué dans du TBST furent ajoutés à chacun des puits et incubés une heure à la température de la pièce. Deux lavages des puits avec le TBST ont suivi cette incubation pour ensuite ajouter à chacun des puits 100  $\mu$ l d'anticorps anti-IgG de souris ou de lapin, selon le cas, conjugué à la phosphatase alcaline. Une incubation d'une heure fut effectuée avec ce second anticorps. Après avoir lavé les puits à trois reprises avec du TBST et une fois avec 100  $\mu$ l de tampon de substrat PNPP (section 4.3.4), la réaction antigène-anticorps a été révélée par l'ajout de 50  $\mu$ l d'une solution de substrat PNPP (section 4.3.4) préparée dans le tampon PNPP. L'incubation fut de 15 à 30 minutes à l'obscurité à la température ambiante. La réaction de révélation a été arrêtée par l'addition de 50  $\mu$ l d'une solution d'EDTA (1/5 EDTA 0.5 M pH 8 dans l'eau distillée) et la réaction colorimétrique fut mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à faisceaux verticaux (Dynatec) à une longueur d'ondes de 405 nm.

### **7.1. Test ELISA avec les phages**

L'antigène adsorbé dans les puits de la microplaque fut des capsides de PPV, soit 0.5  $\mu$ g/puits. Des capsides normales ainsi que des capsides ayant subies un choc thermique à 55°C et 72°C durant deux minutes ont été utilisées pour cette expérimentation. Le choc thermique s'est effectué à l'aide d'un bain incubateur à sec (Fisher Scientific) réglé à la température désirée où de l'eau fut ajouté dans les puits utilisés. Dans des tubes de 1.5 ml (Sarstedt), la préparation des capsides de PPV dans 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.6 s'est effectuée et un tube a été par la suite déposé dans un des puits du bain contenant l'eau réglé à 55°C et incubé pendant deux minutes. Une fois la température du bain ajustée à 72°C, un autre tube fut incubé durant deux minutes. Suite à ces traitements, les capsides ont pu être adsorbées aux puits du plateau. Le test ELISA s'est déroulé comme décrit précédemment (section 7) où les phages sélectionnés soit #

6, 7, 8 et 10 furent préparés dans du TBST afin d'obtenir un même titre d'environ  $10^{13}$  phages/ml. L'anticorps primaire utilisé fut l'anticorps monoclonal de souris anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech) d'une dilution de 1/5000 dans du TBST. L'anticorps anti-IgG de souris conjugué à la phosphatase alcaline (Goat Anti-Mouse IgG [H+L]-AP conjugate, Bio-Rad) dilué 1/500 dans du TBST fut utilisé comme second anticorps.

## **7.2. Test ELISA avec les protéines phagiques**

Des capsides normales et d'autres soumises à un choc thermique à 72°C pour deux minutes furent adsorbées dans les puits d'une microplaque à raison de 0.5 µg/puits. Les protéines phagiques reliées aux phages # 6, 7, 8 et 10 (section 5.4) ont été utilisées suite à une dilution 1/300 de chacune d'elles dans du TBST. Le sérum de lapin # 414 SAT (section 6.3) dilué 1/1000 dans du TBST fut employé à titre de premier anticorps. Ce sérum possède une affinité envers la thioredoxine présente dans ces protéines de fusion. Le second anticorps fut l'anti-IgG de lapin couplé toujours à la phosphatase alcaline (Goat Anti-Rabbit IgG [H+L]-AP conjugate, Bio-Rad). La dilution préparée dans le TBST fut 1/500.

## **7.3. Test ELISA avec le sérum # 416 VP1 up**

Pour cette expérimentation, plusieurs échantillons de capsides de PPV furent soumis à divers chocs thermiques soit un échantillon à 55°C, un autre à 65°C, à 72°C et un dernier à 85°C. Des puits d'une microplaque furent donc enrobés de ces capsides ainsi que de capsides n'ayant subies aucun traitement. Aucun des phages ni des protéines phagiques ne fut utilisé pour ce test ELISA. Après l'incubation du plateau dans la solution de blocage, les puits ont été lavés à deux reprises avec du TBST pour ensuite être mis en présence du premier anticorps qui fut le sérum de lapin # 416 VP1 up (section 6.2) d'une dilution de 1/1000 dans le TBST. À titre de témoin négatif, le sérum # 414 SAT dilué 1/1000 dans le TBST fut ajouté à certains puits au lieu du sérum # 416 VP1

up. L'anticorps secondaire utilisé pour tous les puits a été l'anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Bio-Rad) d'une dilution de 1/500 dans du TBST.

## 8. TITRE D'INFECTIVITÉ VIRALE

Dans une microplaque de 96 puits (Linbro®/Titertek®),  $10^4$  cellules/puits à raison de  $100 \mu\text{l}$  furent ajoutés à divers puits pour ensuite être incubés à  $37^\circ\text{C}$  en conditions de croissance normales pendant une nuit (environ 12 heures). Après cette incubation, cinq échantillons viraux furent préparés soit  $5 \mu\text{l}$  de PPV complété à un volume de  $15 \mu\text{l}$  avec du tampon TE (10 mM Tris •Cl pH 8, 1 mM EDTA) où un échantillon fut non-traité tandis que les autres furent soumis à un choc thermique à  $55^\circ\text{C}$ ,  $65^\circ\text{C}$ ,  $72^\circ\text{C}$  et  $85^\circ\text{C}$  pendant deux minutes. Suite aux différents traitements, chacun des échantillons ont été centrifugés dans une centrifugeuse de table pendant un court laps de temps et  $5 \mu\text{l}$  des surnageants furent ajoutés à  $995 \mu\text{l}$  de milieu DMEM complet contenus dans d'autres tubes. À partir de ces différentes préparations virales de 1 ml, des dilutions séquentielles 1/10 des différents échantillons furent réalisées dans du milieu DMEM complet jusqu'à une dilution de  $10^{-8}$ . Ensuite, chacune de ces préparations furent mises en présence des cellules soit  $100 \mu\text{l}$  par puits appropriés (4 puits/dilutions/échantillons) et l'infection s'est déroulée à  $37^\circ\text{C}$  pour une période de 24 heures. Une fois l'incubation terminée, le milieu contenu dans les puits fut retiré et  $80 \mu\text{l}$  de tampon d'immunofluorescence, tampon IF (Sanofi Diagnostic Pasteur), contenant 3% [v/v] de formaldéhyde ont été ajoutés à chacun des puits. La fixation s'est déroulée toute la nuit à  $4^\circ\text{C}$ . Une fois la solution de fixation enlevée, les puits furent incubés 30 minutes dans  $80 \mu\text{l}$  de tampon IF contenant 3% [v/v] de Triton X-100. Les puits furent ensuite rincés avec  $100 \mu\text{l}$  de PBS à deux reprises et incubés cette fois-ci en présence de  $100 \mu\text{l}$  de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 d'une dilution de 1/40 dans du tampon IF. Suite à l'incubation d'une heure avec cet anticorps, les puits ont à nouveau été lavés deux fois avec  $100 \mu\text{l}$  de PBS pour ensuite être incubés avec  $100 \mu\text{l}$  l'anticorps anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Rokland) dilué 1/500 dans le tampon IF. L'incubation s'est effectuée pendant deux heures à l'obscurité. Suite à cette incubation, les puits ont été



lavés deux fois avec 100  $\mu$ l de PBS pour ensuite observer les puits à l'aide d'un microscope à fluorescence. Lors de l'observation au microscope, une dilution est choisie pour chacun des échantillon où il est possible de compter entre 20 et 200 cellules infectées et le titre fut déterminé selon le nombre d'unités formant des foyers fluorescents (UFF) d'infection (noyaux positifs).

## 9. MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

### 9.1. Immunodétection à l'or colloïdal

Étant donné une concentration virale de 0.2  $\mu$ g/ul soit environ  $10^{10}$  particules/ul, une dilution de 1/10 fut effectuée pour chacun des échantillons viraux utilisés et ce, dans du tampon TE (10 mM Tris •Cl pH 8, 1 mM EDTA). Les dilutions ont eu lieu suite au traitement des capsides virales à la chaleur, c'est-à-dire un échantillon viral a subi un choc thermique de deux minutes à 55°C, un autre à 65°C, un autre à 72°C et un dernier à 85°C. Un échantillon de virus fut aussi utilisé sans qu'il ait subi de traitement. Donc, une fois les échantillons traités et non-traités furent dilués, 100  $\mu$ l de chacun furent déposés dans un microtube (Beckman) dans lequel une grille de nickel fut aussi déposée. Les tubes ont ensuite été centrifugés durant cinq minutes à 20 psi dans une ultracentrifugeuse (Beckman® Airfuge™, Air-Driven Ultracentrifuge). Les grilles furent retirées des tubes et séchées à l'aide d'un papier buvard avant d'être trempées une fois dans chacune goutte de PBS et ensuite dans chacune goutte de PBS contenant 1% de BSA pendant cinq minutes. Par la suite, les grilles ont été déposées sur chacune goutte de PBS contenant le premier anticorps soit 1/100 de sérum de lapin # 416 VP1 up pour les échantillons traités et un non-traité (témoin négatif) et 1/100 de sérum de lapin anti-PPV pour l'autre échantillon non-traité (témoin positif) pour une incubation de deux heures à la température ambiante. Les grilles furent lavées trois fois une minute dans une goutte de PBS et à nouveau dans une goutte de PBS contenant 1% de BSA pour cinq minutes. Les grilles furent ensuite déposées sur chacune goutte de PBS contenant le deuxième anticorps soit 1/10 d'anticorps marqués à l'or (Colloïdal Gold-affiniPure Goat anti-rabbit, IgG: 12 nm, Jackson ImmunoResearch) et spécifiques aux premiers anticorps utilisés

pour 30 minutes à la température ambiante aussi. Ensuite, les grilles ont été lavées encore une fois deux minutes dans une goutte de PBS et trois fois 1 minute 40 secondes dans de l'eau distillée. Enfin, les grilles ont été asséchées à nouveau avec du papier buvard pour ensuite être déposées dans chacune goutte de PTA 3% (acide phosphotungstique, Mecalab LTP) pendant une à cinq minutes. Suite à la coloration, les grilles furent asséchées une dernière fois afin d'être observées au microscope électronique à transmission (Hitachi, 7100).

## 10. SUSCEPTIBILITÉ DE L'ADN VIRAL DU PPV À L'ENVIRONNEMENT EXTERNE

Pour cette expérimentation, plusieurs échantillons de capsides de PPV furent soumis à divers chocs thermiques soit un échantillon à 55°C, un à 65°C, un autre à 72°C et un dernier à 85°C. Un échantillon contenant des capsides natives fut aussi utilisée. Suite à ces traitements, 5  $\mu$ l de tous les échantillons viraux y compris celui contenant les capsides natives furent incubées en présence de DNase I (10 U/ $\mu$ l, Roche Diagnostics), de tampon REact® 2 (10X, Invitrogen) pour un volume total de 40  $\mu$ l. L'incubation s'est déroulée à 37°C pour 30 minutes. La réaction fut arrêtée par l'ajout de 20 mM EDTA. Par la suite, afin de dénaturer les capsides, 3  $\mu$ l de protéinase K (20 mg/ml) ainsi que 1% [p/v] de SDS furent ajoutés à chacun des échantillons en complétant le volume à 100  $\mu$ l. Tous les tubes ont été incubés dans un bain-marie réglé à une température de 55°C et ce, pour 30 minutes. Une purification au phénol/chloroforme fut alors effectuée suivie par une précipitation à l'acétate d'ammonium (voir section 4.3.3.) et les culots ont été resuspendus avec 15  $\mu$ l d'eau distillée.

Pour le témoin positif et négatif, 20  $\mu$ l de capsides ont été mis dans un tube de 1.5 ml (Sarstedt) pour ensuite procéder à la dénaturation des capsides comme précédemment. Une fois l'ADN purifié, précipité et resuspendu, 5  $\mu$ l de la suspension fut prise à titre de témoin négatif afin de procéder à la dégradation de l'ADN viral par la DNase. Les 10  $\mu$ l restant furent utilisés comme témoin positif où l'ADN viral ne fut aucunement mise en présence de DNase et chargés directement sur le gel. Le gel d'agarose d'une concentration de 0.8% [p/v] a été obtenu en dissolvant 0.4 g d'agarose (Gibco BRL®)

dans 50 ml de TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.114% [v/v] acide acétique glacial). Une fois le gel polymérisé, la même procédure que celle décrite à la section 1.3 a été effectuée. La quantité d'échantillons chargés fut de 10  $\mu$ l pour le témoin positif et 15  $\mu$ l pour tous les autres échantillons.

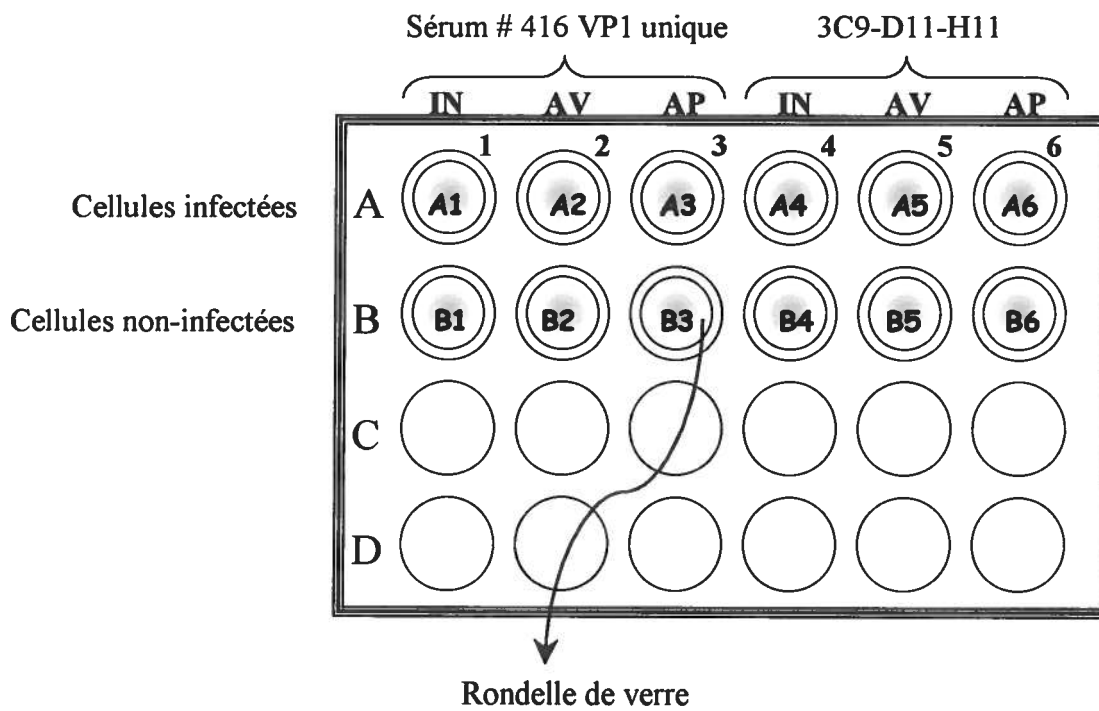
## 11. IMMUNOFLUORESCENCE

À partir de cellules PT cultivées dans un flacon de 150 cm<sup>2</sup> (Corning®) où la confluence du feuillet cellulaire fut de 100%, environ  $1.25 \times 10^5$  cellules (500  $\mu$ l/puits) dans du milieu DMEM complet ont été déposées dans les puits de trois plaques de culture Costar® (modèle 3524, Corning Incorporated) où des rondelles de verre (cercle 12 mm, Fisherbrand®, Fisher Scientific) identifiées furent déjà ajoutées. Les cellules furent par la suite incubées en condition de croissance normale pour une nuit. Les cellules non-infectées et infectées furent traitées différemment où la description des traitements est spécifiée à la *figure 7*. L'infection des cellules s'est effectuée à l'aide de 2  $\mu$ l de virus PPV d'une concentration virale de 0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l. La durée de l'infection fut de 4 heures pour une plaque, de 8 heures pour une seconde plaque et de 12 heures pour les cellules contenues dans la troisième plaque et ce, à 37°C. Une fois l'infection terminée, le milieu de culture fut retiré des puits et les cellules ont été fixées avec 500  $\mu$ l de tampon d'immunofluorescence, tampon IF (Sanofi Diagnostic Pasteur), contenant 3% [v/v] de formaldéhyde. La fixation s'est déroulée toute la nuit à 4°C. Une fois la solution de fixation enlevée, les puits furent incubés 30 minutes dans 500  $\mu$ l de tampon IF contenant 3% [v/v] de Triton X-100. Les puits furent ensuite rincés avec 200  $\mu$ l de PBS à deux reprises et incubés cette fois-ci en présence de 500  $\mu$ l du premier anticorps qui fut, pour certains puits, l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 d'une dilution de 1/40 dans du tampon IF et pour les autres puits, le sérum de lapin # 416 VP1 up dilué 1/300 dans du tampon IF. Suite à l'incubation d'une heure avec ces anticorps, les puits ont à nouveau été lavés deux fois avec 200  $\mu$ l de PBS pour ensuite être incubés avec 500  $\mu$ l du second anticorps soit l'anti-IgG de souris couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (Rokland) dilué 1/500 dans le tampon IF pour le 3C9 et l'anti-IgG de lapin conjugué à la

FITC (Sanofi Diagnostic Pasteur) d'une dilution de 1/250 dans le tampon IF pour le sérum de lapin. L'incubation s'est effectuée pendant deux heures à l'obscurité. Après avoir vidé les puits, 200  $\mu$ l d'une solution de réactif de Hoechst 33258 (0.5 mg/ml, Sigma) furent ajoutés à chacun des puits afin de colorer les noyaux des cellules. L'incubation s'est poursuivie à l'obscurité pendant 15 minutes. Les rondelles de verre contenues dans chaque puits furent enlevées pour être déposées dans d'autres puits contenant 500  $\mu$ l de PBS. Ces rondelles ont été rincées une autre fois avec du PBS. Sur des lames de microscope de grandeur 25x75x1 mm (Fisherbrand®), des gouttes d'une solution composée de 10 mM Tris •Cl pH 7.8, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA et 50% [v/v] glycérol furent ajoutées afin d'apposer une rondelle de verre sur chacune des gouttes (le côté avec les cellules fixées contre la goutte). Une fois les rondelles bien collées à la lame et que le surplus de solution fut épongé à l'aide de papiers Kimwipes® (Kimberly-Clark®), les rondelles furent fixées avec du vernis à ongles mis sur les pourtours des rondelles. L'observation des lames s'est effectuée avec un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800 où les blocs de longueur d'ondes utilisés furent le bloc UV-2A 330-380 nm et le bloc b-2a 450-490 nm, soit respectivement une émission à 420 nm pour le réactif Hoechst et à 530 nm pour l'immunofluorescence spécifique.

- Figure 7 :** *Plateau de culture cellulaire*
- Puits A1 et A4 → infection normale, aucun traitement;*
  - Puits A2 et A5 → avant l'infection, les capsides virales PPV-NADL-2 furent soumises à un choc thermique puis mises en présence des cellules;*
  - Puits A3 et A6 → après l'infection, les cellules infectées ont subi un choc thermique avant la fixation;*
  - Puits B1 à B6 → puits témoins où les cellules ne furent pas infectées mais ont subi le même traitement (choc thermique après infection), s'il y a, que leur puits correspondant.*

*Description des traitements lors de l'immunofluorescence, soit un choc thermique avant l'infection où une quantité de virus contenue dans un tube fut placée dans un bain-marie d'une température de 72°C et ce, pour deux minutes pour ensuite procéder à l'infection des cellules appropriées; le choc thermique après l'infection s'est déroulé comme suit où les rondelles contenues dans chacun des puits désignés pour ce traitement furent retirées délicatement de ces puits après l'infection pour être déposées sur un bain incubateur à sec en prenant garde à la surface de la rondelle sur laquelle les cellules sont adhérees. La température fut de 72°C et l'incubation s'est effectuée pendant deux minutes. Les rondelles furent remises dans leur puits afin de procéder à la fixation.*



# *RÉSULTATS*

## 1. ACCESSIBILITÉ DES ÉPITOPES SPÉCIFIQUES À LA VP1 À LA SURFACE DE LA CAPSIDE

La région unique de la VP1 ne semble pas être accessible de l'extérieur de la capsidie puisque selon Zádori et ses collaborateurs (2001), aucune activité enzymatique PLA<sub>2</sub> n'est détectée chez les particules virales nouvellement formées. De plus, en supposant que la VP1 up réside à l'intérieur de la capsidie, il est suggéré qu'un stimulus externe serait en mesure d'induire l'exposition de cette séquence spécifique à la surface de la particule virale (Cotmore *et al.*, 1999). À l'aide d'une librairie phagique, il fut possible de vérifier la véracité de ces observations chez le PPV et ainsi déterminer la localisation de la VP1 up avant et après que la particule virale soit exposée à un choc thermique.

### 1.1. Librairie phagique

Pour pallier au manque d'anticorps monoclonaux dirigés contre la VP1 up du parvovirus porcin, l'utilisation d'une banque peptidique fut donc choisie. Par l'entremise de la librairie phagique Ph.D.-7<sup>TM</sup> de New England Biolabs, il fut possible de sélectionner et d'identifier des séquences peptidiques de hautes affinités envers la molécule-cible soit la région unique de la protéine structurale VP1.

#### 1.1.1. Spécificité des phages isolés

La vérification de la spécificité des phages s'est effectuée à l'aide d'un test ELISA où la VP1 up purifiée ainsi que la protéine de fusion VP1 up furent utilisées comme protéines cibles. Chaque clone phagique fut amené à s'attacher à la molécule-cible fixée à une microplaque. L'anticorps anti-M13 servi d'anticorps primaire et la détection de l'interaction s'est réalisée par l'ajout du substrat colorimétrique PNPP (*Figure 8*). Le coliphage M13 sauvage adsorbé dans certains puits fut utilisé comme témoin afin d'évaluer le bruit de fond de la détection en plus de déterminer le seuil de



positivité de la réaction. Suite à la lecture de la densité optique en spectrophotométrie, il a été possible de sélectionner plusieurs clones soit les phages 3, 5, 6, 7, 8 et 10.

### **1.1.2. Séquençage de l'ADN phagique**

Suite au séquençage de ces ADN phagiques à l'aide de l'amorce-28gIII, il fut possible de vérifier le patron peptidique de chacun de ces phages. Il a été noté que, à l'exception des clones 3 et 5 présentant une séquence peptidique similaire au clone 10, aucun motif peptidique commun ne fut trouvé parmi tous les autres phages (*Tableau III*). Les clones sélectionnés pour la réalisation des analyses ultérieures furent donc les phages 6, 7, 8 et 10.

### **1.2. VP1 up détectée par les phages sélectionnés suite à un choc thermique**

À l'aide des quatre phages sélectionnés, un autre test ELISA fut réalisé cette fois comme première tentative dans la détection de ce domaine unique à la surface des capsides virales. Pour cette expérience, des capsides du PPV furent immobilisées sur un plateau ELISA en plus de capsides ayant subies un choc thermique à 55°C et à 72°C pendant deux minutes. Suite à la mise en présence avec chacun des phages dans les puits appropriés, l'anticorps anti-M13 fut utilisé ainsi qu'un anti-souris couplé à la phosphatase alcaline permettant la détection colorimétrique par l'ajout du substrat PNPP (*Figure 9*). Le coliphage M13 sauvage fut utilisé comme témoin négatif donnant un résultat inférieur à 0.050 de densité optique pour les trois cas. Il fut possible de constater que les phages interagissaient faiblement avec les capsides virales normales et avec les capsides soumises à un choc thermique de 55°C. Par contre, l'effet contraire soit une forte interaction des phages avec les capsides a été observée pour les capsides ayant subies un choc thermique à 72°C supposant ainsi une meilleure accessibilité de cette région unique à la surface de la capside.

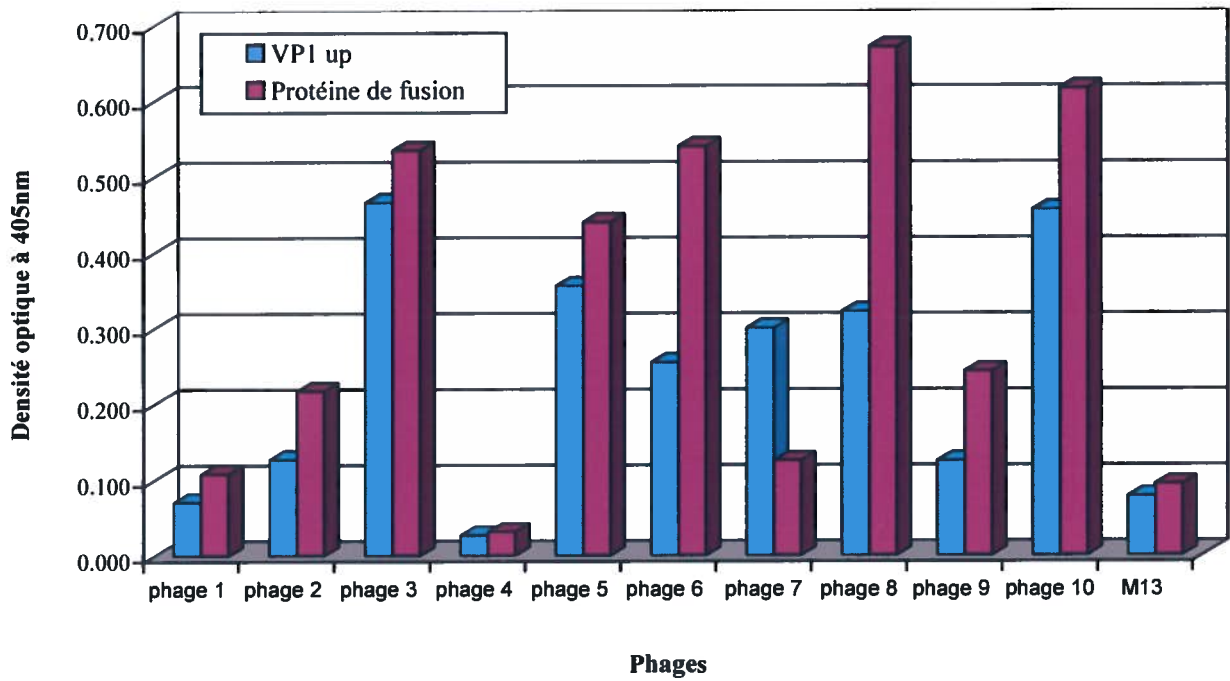
**Figure 8 :** *Mesure de la spécificité des phages*

- A) *Des protéines VP1 up purifiées ainsi que des protéines de fusion VP1 up (100 µg/ml) furent immobilisées sur une plaque ELISA pour ensuite être mises en présence d'environ  $10^{11}$  phages numérotés de 1 à 10 (provenant de dix plages de lyse différentes) par puits appropriés. Le phage sauvage M13 est utilisé à titre de témoin négatif. Les densités optiques furent mesurées suite à une incubation des puits avec le substrat de la phosphatase alcaline soit le PNPP et prises à 405 nm. Expérience effectuée en duplicata.*

**Tableau III :** *Séquences nucléiques et peptidiques des phages sélectionnés*

- B) *Séquences exposées en surface des phages isolés à l'aide de la librairie Ph.D.-7<sup>TM</sup> suite à l'extraction des ADN phagiques et au séquençage de ceux-ci.*

A)

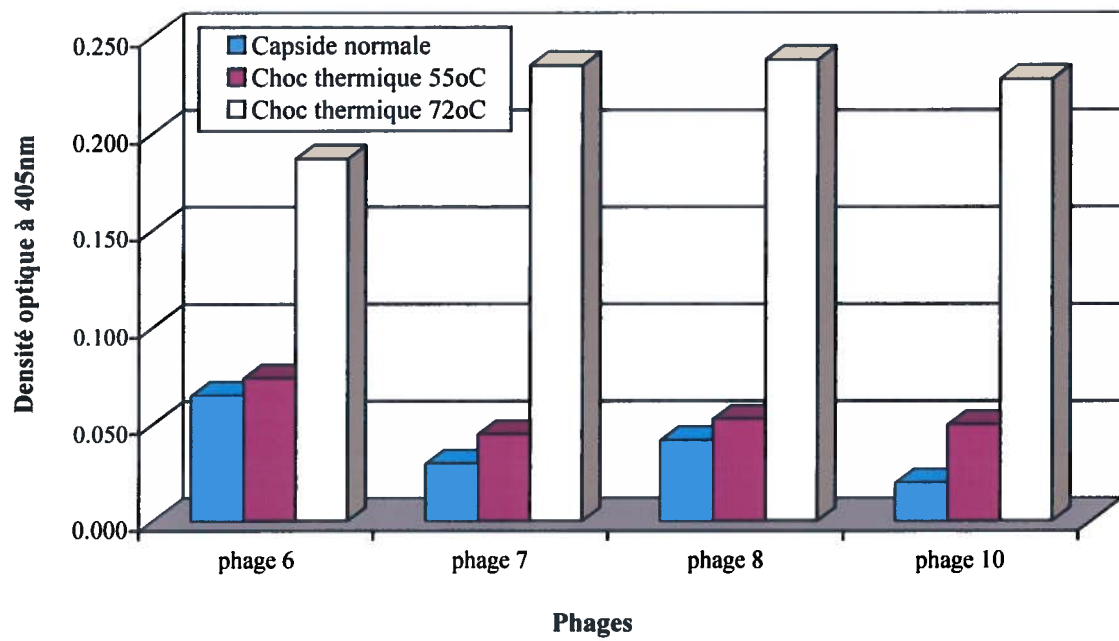


B)

Clones	Séquences nucléiques	Séquences peptidiques
6*	GTG AAT CAG TCT TAT ACT TCG ACT TGG TTT TGG GCT	VNQSYTSTWFWA
7*	TGG TCT AGT TCG CAT TAT CCT CCG CAT TGG ACT GCG	WSSHYPHWTA
8*	TGG CCT CAG TTG TTT ACT TTT CCG TGT TGT AAT CCT	WPQLFTFPCCNP
3-5-10*	GGT CTG AAG ATT TGG AGT TTG CCG CCG CAT CAT GGG	GLKIWSLPPHHG

\* Clones sélectionnés pour les analyses ultérieures

**Figure 9 :** *Test ELISA utilisant les phages sélectionnés*  
*Des capsides natives, des capsides exposées à un choc thermique à 55°C et d'autres à 72°C durant 2 min furent adsorbées sur un plateau ELISA (0.5 µg/puits) pour ensuite être mises en présence des phages 6, 7, 8 et 10 (10<sup>11</sup> phages/puits). La détection colorimétrique fut effectuée par l'ajout du substrat PNPP et la densité optique mesurée à 405 nm. Expérience effectuée en duplicata.*



### 1.3. Protéines phagiques

Pour l'étude de la VP1 up lors de l'infection virale, ces peptides exposés en surface des phages sélectionnés semblaient être un excellent outils de détection. Seulement, il a fallu construire des peptides synthétiques puisque l'utilisation des phages directement en culture cellulaire est inadéquate.

#### 1.3.1. Synthèse des oligonucléotides

Un deuxième séquençage de l'ADN phagique de ces quatre phages fut réalisé cette fois avec l'amorce-96gIII, amorce recommandée pour un séquençage automatique, pour ensuite permettre la synthèse des oligonucléotides à l'aide des séquences en 5' et 3' de chacun des ces phages (*Tableau II*).

#### 1.3.2. Expression des protéines phagiques

Le système d'expression pBAD/TOPO thiofusion modifié fut utilisé lors du clonage de ces séquences nucléotides nouvellement synthétisées. Suite à l'expression, quatre protéines de fusion ont été obtenues.

##### 1.3.2.1. Purification des protéines

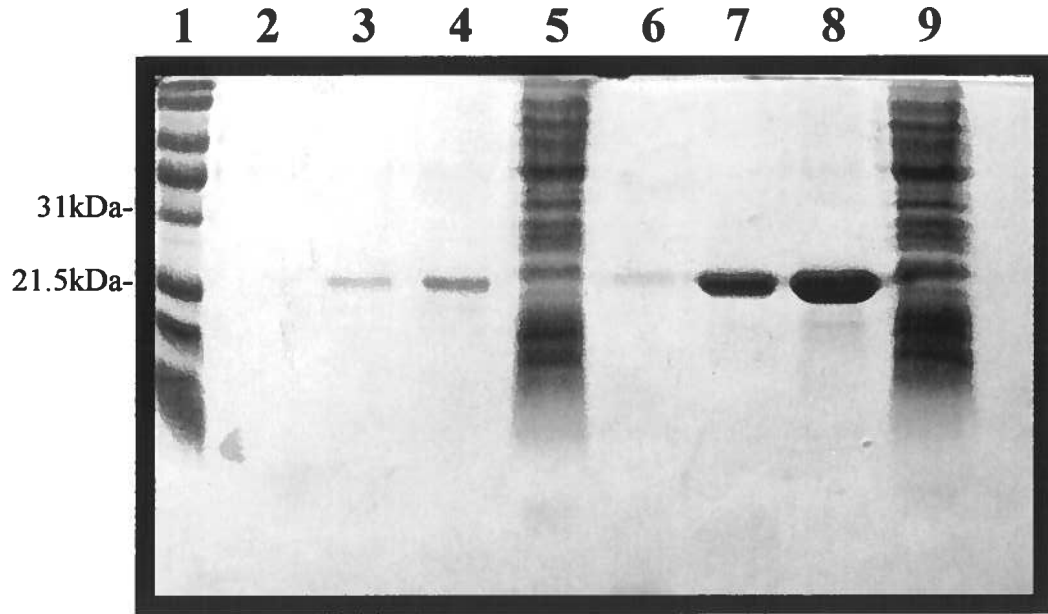
Les profils d'électrophorèse de la *figure 10* permettent de démontrer la réussite de la purification réalisée sur une colonne de résine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose ainsi que l'existence d'une protéine pour chacun des phages 6, 7, 8 et 10 d'une masse moléculaire se situant entre 21.5 kDa et 31 kDa.

**Figure 10 :** *Profils électrophorétiques de la purification des protéines phagiques induites dans le système d'expression pBAD/TOPO thiofusion modifié*

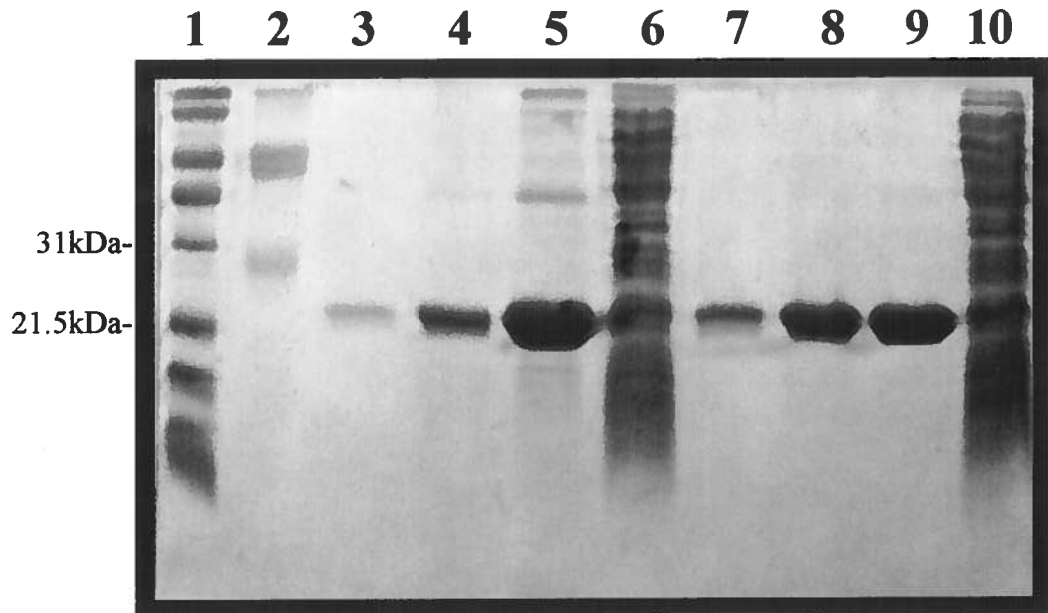
- A) Puits 1 : Échelle de masses moléculaires multiples «Broad Range Ladder» de Bio Rad, 1  $\mu$ l  
 Puits 2 : 10  $\mu$ l du premier éluat recueilli pour la protéine du phage 6  
 Puits 3 : 10  $\mu$ l du troisième éluat recueilli pour la protéine du phage 6  
 Puits 4 : 10  $\mu$ l du second éluat recueilli pour la protéine du phage 6  
 Puits 5 : 10  $\mu$ l du surnageant recueilli suite à l'incubation de l'échantillon de la protéine du phage 6 avec la résine de nickel  
 Puits 6 : 10  $\mu$ l du premier éluat recueilli pour la protéine du phage 7  
 Puits 7 : 10  $\mu$ l du troisième éluat recueilli pour la protéine du phage 7  
 Puits 8 : 10  $\mu$ l du second éluat recueilli pour la protéine du phage 7  
 Puits 9 : 10  $\mu$ l du surnageant recueilli suite à l'incubation de l'échantillon de la protéine du phage 7 avec la résine de nickel.
- B) Même principe seulement les puits 3 à 6 représentent les résultats pour la protéine phagique 8 tandis que les puits 7 à 10, représentent ceux obtenus pour la protéine phagique 10.

\* Puits 2 = aucune signification

**A)**



**B)**

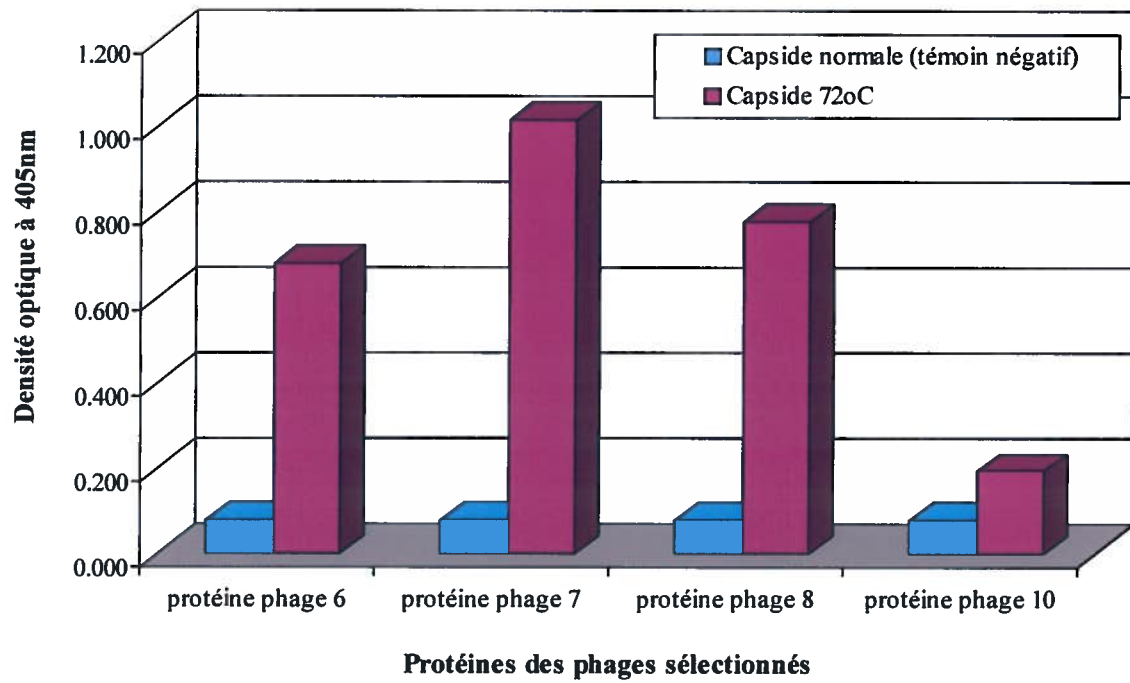




#### 1.4. Affinité des protéines de fusion envers la région unique de la VP1

Afin de vérifier l'affinité de ces protéines envers la région unique de la VP1 des capsides virales, un test ELISA a été réalisé de sorte que des capsides normales du PPV et d'autres exposées à un choc thermique de 72°C soient utilisées comme molécules-cibles. Le sérum de lapin # 414 SAT possédant une affinité envers la thioredoxine présente dans la construction des protéines de fusion fut employé à titre de premier anticorps tandis que l'anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline fut le second. C'est par l'entremise du substrat PNPP qu'une détection colorimétrique a pu avoir lieu. La *figure 11* représente les résultats obtenus où il est possible de constater qu'une interaction avec la molécule-cible semble plus importante avec ces peptides synthétiques comparativement à celle obtenue avec les phages à l'exception de la protéine reliée au phage 10. De plus, comme prévu, le domaine unique à la VP1 devient plus accessible lorsque les capsides sont soumises à un choc thermique d'une température de 72°C.

**Figure 11 :** *Détection de la VP1 up à l'aide des protéines phagiques*  
*Des capsides natives ainsi que des capsides exposées à un choc thermique à 72°C durant 2 min furent adsorbées sur un plateau ELISA (0.5 µg/puits) pour ensuite être mises en présence des quatre protéines phagiques induites (dilution 1/300 dans du TBST). L'anticorps primaire utilisé fut le sérum polyclonal # 414 SAT pour une dilution de 1/1000. La détection colorimétrique fut effectuée par l'ajout du substrat PNPP et la densité optique mesurée à 405 nm. Expérience effectuée en duplicata.*



## 2. INTÉGRITÉ DE LA CAPSIDE DU PPV SUITE À UN STIMULUS EXTERNE

Malheureusement, les expériences effectuées *in vitro* avec les protéines phagiques obtenues furent vaines. Il fut donc nécessaire de procéder à la production d'un anti-sérum polyclonal spécifique à l'antigène VP1 up et ce, dans le lapin afin de poursuivre l'étude de ce peptide unique.

### 2.1. Exposition du domaine spécifique à la VP1 induite par choc thermique

Suite à l'obtention de ce sérum, les capsides du parvovirus porcin furent soumises à différents chocs thermiques soit certaines à 55°C, 65°C, 72°C et d'autres à 85°C toujours pour deux minutes. En plus des capsides sans traitement, elles furent adsorbées sur une microplaque afin de procéder au test ELISA. Celui-ci consistait à incuber les capsides en présence soit du sérum polyclonal # 416 VP1 up ou du sérum polyclonal #414 SAT comme témoin négatif et à l'aide d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline, la détection colorimétrique a pu avoir lieu en ajoutant le substrat approprié (*Figure 12*). En observant les résultats obtenus, il fut ainsi possible de conclure que la région unique de la VP1 devient de plus en plus accessible à la surface de la capside lorsque le choc thermique est d'une température plus élevée. Cependant, rien n'indique si ce domaine est exposé à la surface par externalisation ou tout simplement parce que la capside est dénaturée.

#### 2.1.1. Titre d'infectivité virale

Parallèlement au test ELISA effectué précédemment, le titre d'infectivité virale s'est effectué pour chacun de ces cas, c'est-à-dire que suite aux différents traitements, des cellules furent infectées avec ces capsides pendant 24 heures à différentes dilutions virales afin de faciliter le dénombrement de cellules infectées par des virions infectieux. La fluorescence notée dans les noyaux fut réalisée à l'aide d'un premier anticorps soit l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 suivi d'un anticorps anti-souris IgG couplé à la

fluorescéine. La courbe logarithmique représentée à la *figure 12* démontre le titre d'infectivité virale obtenu pour les capsides natives et pour celles ayant subi un choc thermique de 55°C, 65°C, 72°C ou 85°C. L'infectivité virale a donc tendance à diminuer lorsque la température du choc thermique augmente puisque le titre d'infectivité est considérablement réduit lors d'un traitement à 85°C. De plus, les résultats obtenus sont inversement proportionnels à ceux retrouvés lors de la détection de la VP1 up exposée au niveau de capsides soumises à des traitements similaires.

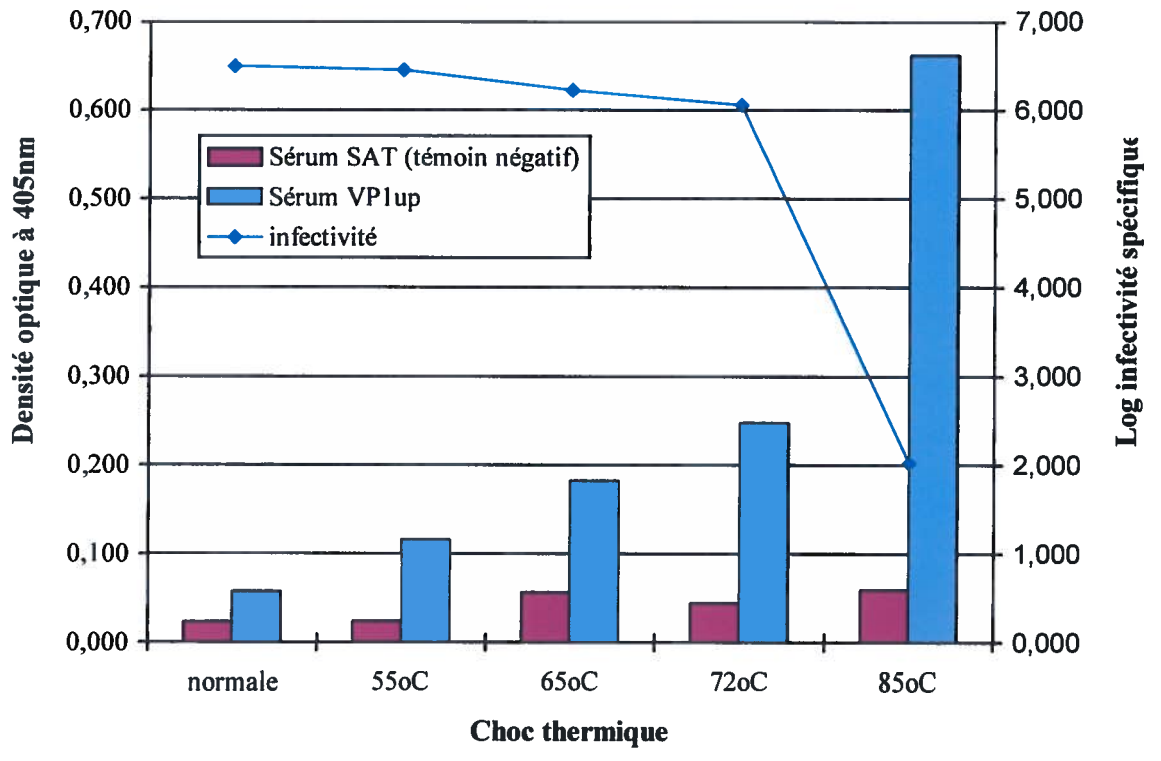
## **2.2. Observation de l'intégrité des capsides suite à divers chocs thermiques**

C'est en immunodétection indirect à l'or colloïdal qu'il a été possible de visualiser en microscopie électronique la conformation des capsides du PPV suite à un choc thermique de 55, 65, 72 ou 85°C en comparaison avec les capsides ne subissant aucun traitement. Ces résultats démontrent bien à la *figure 13* que la capside demeure intacte lors de ces traitements à l'exception du choc thermique à 85°C où une dénaturation complète est suspectée vu l'absence totale de la structure en icosaèdre. De plus, en utilisant le sérum de lapin # 416 comme précédemment suivi de l'anticorps couplé aux billes d'or, les mêmes conclusions peuvent être émises au sujet de la VP1 up soit qu'elle semble partiellement exposée lors d'un choc thermique de 55°C, devenant un peu plus accessible à une température de 65°C et encore plus lorsque le choc thermique est effectué à 72°C. Le témoin négatif et positif furent des capsides ne subissant aucun choc thermique mis en présence du sérum # 416 VP1 up et d'un sérum polyclonal anti-PPV, respectivement.

**Figure 12 :** *ELISA effectué avec le sérum polyclonal # 416 VP1 up et SAT*  
*Des puits d'une microplaque furent enrobés de capsides natives et de capsides exposées à un choc thermique à 55°C, 65°C, 72°C ou 85°C durant 2 min. L'anticorps primaire utilisé fut le sérum # 416 VP1 up d'une dilution de 1/1000 dans du TBST. Le sérum polyclonal # 414 SAT fut utilisé comme témoin négatif (dilution 1/1000). La détection colorimétrique fut effectuée par l'ajout du substrat PNPP réagissant avec la phosphatase alcaline couplée à l'anticorps secondaire et la densité optique mesurée à 405 nm. Expérience effectuée en duplicata.*

**Titre d'infectivité virale**

*Des cellules permissives PT furent infectées avec diverses préparations de virus à différentes dilutions ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , ...,  $10^{-8}$ ) soit certaines avec des capsides natives et d'autres avec des capsides ayant été soumises à un choc thermique à 55°C, 65°C, 72°C ou 85°C pendant 2min avant l'infection. L'infection fut d'une durée de 24 heures et le nombre de noyaux présentant une fluorescence fut dénombré. L'anticorps primaire utilisé était le 3C9-D11-H11 et l'anticorps secondaire, un anti-souris IgG couplé à la FITC. La courbe fut donc élaborée selon le logarithme du nombre de cellules infectées pour une dilution donnée (UFF/ $\mu$ l) en fonction des différents traitements appliqués. Expérience effectuée en duplicata.*



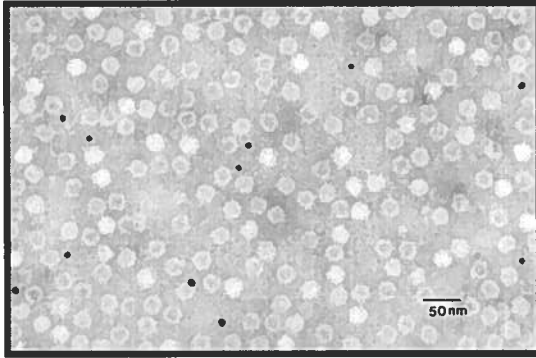
**Figure 13 : Immunomarquage indirect à l'or colloïdal**

- A) Capsides sans choc thermique mises en présence du sérum de lapin # 416 VP1 up représentant le témoin négatif.
- B) Capsides sans choc thermique mises en présence du sérum de lapin anti-PPV représentant le témoin positif.
- C) Capsides traitées à la chaleur soit un choc thermique à 55°C pendant 2 min, mises en présence du sérum # 416 VP1 up.
- D) Capsides ayant subies un choc thermique à 65°C pendant 2 min, mises en présence du sérum # 416 VP1 up.
- E) Capsides soumises à un choc thermique à 72°C pendant 2 min pour ensuite être incubée en présence du même sérum # 416 VP1 up.
- F) Capsides ayant subies un choc thermique à 85°C pendant 2 min et incubation en présence du sérum # 416 VP1 up.

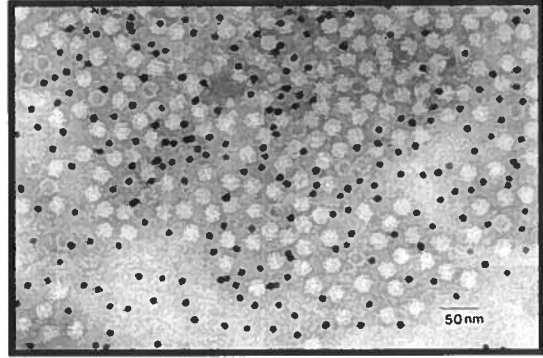
*Microphotographies d'images de capsides du parvovirus porcin obtenues en microscopie électronique agrandie 196,400X.*



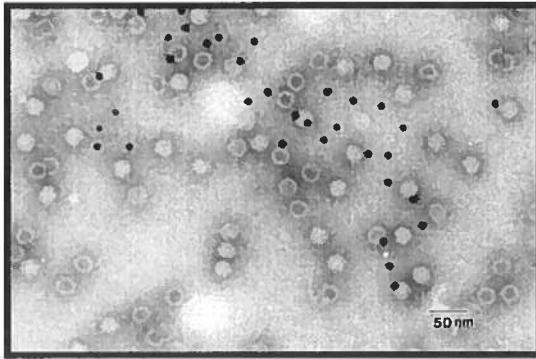
**A)** *Témoin négatif*



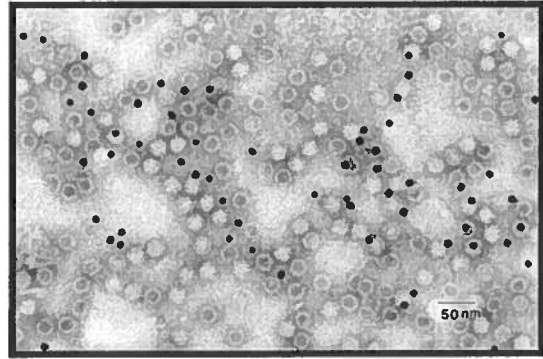
**B)** *Témoin positif*



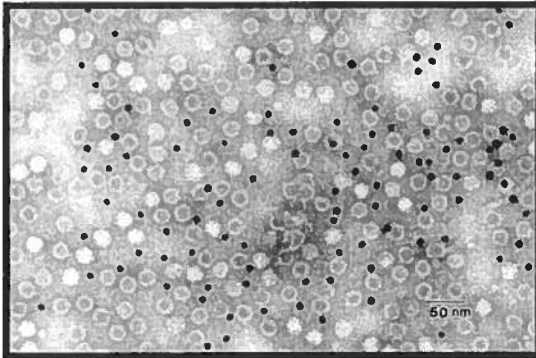
**C)** *Choc thermique 55°C*



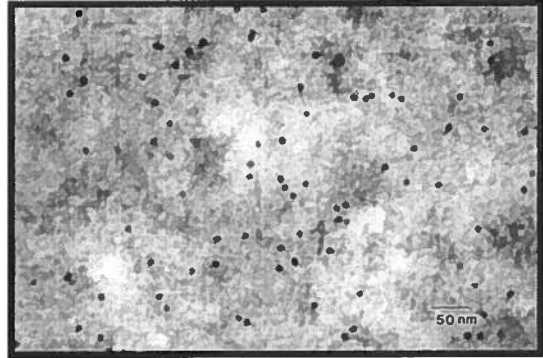
**D)** *Choc thermique 65°C*



**E)** *Choc thermique 72°C*



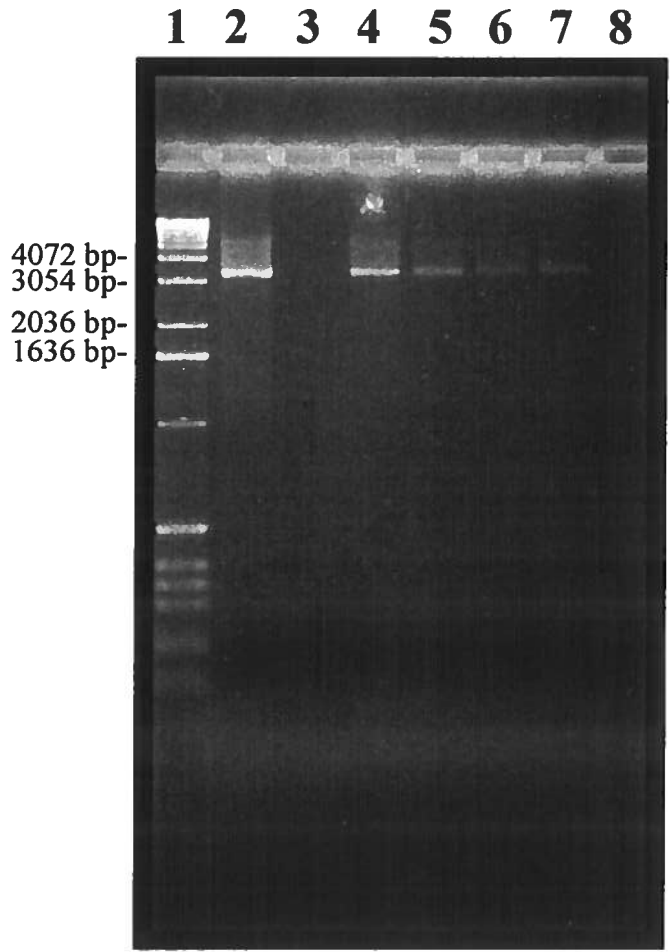
**F)** *Choc thermique 85°C*



### 3. ACCESSIBILITÉ DE L'ADN VIRAL À L'ENVIRONNEMENT EXTERNE

Afin de déterminer si l'ADN viral demeure protégé de l'environnement externe dans la particule lorsque celle-ci subit un changement conformationnel induit par un choc thermique, des capsides natives et d'autres ayant subies un choc thermique soit de 55°C, 65°C, 72°C ou 85°C furent mises en présence de DNase. Après dénaturation des capsides et purification/précipitation de l'ADN viral, c'est sur un gel d'agarose 0.8 % qu'il fut possible d'observer que l'ADN devient progressivement exposé à partir d'une température de 55°C (*Figure 14*). Lors d'un choc thermique à 85°C, l'ADN viral semble complètement susceptible à la DNase, représenté par l'absence de bande au puits 8 sur le gel, supposant une dénaturation de la capside à une température supérieure à 72°C. Le témoin positif fut réalisé en dénaturant la capside sans mettre l'ADN viral en présence de DNase tandis que pour le témoin négatif, de la DNase fut ajoutée après la dénaturation des capsides virales.

- Figure 14 :** *ADN viral du PPV*  
*Électrophorèse sur gel d'agarose 0.8 % (p/v) de la susceptibilité de l'ADN viral à l'environnement externe suite à un choc thermique soumis à la capsidite du virus.*
- Puits 1 :* 5 µl du marqueur de taille (bp), 1 Kb  
*Puits 2 :* 15 µl du témoin négatif soit ADN viral en absence de DNase  
*Puits 3 :* 15 µl du témoin positif soit ADN viral en présence de DNase  
*Puits 4 :* 15 µl de l'ADN viral provenant des capsides natives  
*Puits 5 :* 15 µl de l'ADN viral provenant des capsides exposées à un choc thermique de 55°C  
*Puits 6 :* 15 µl de l'ADN viral provenant des capsides exposées à un choc thermique de 65°C  
*Puits 7 :* 15 µl de l'ADN viral provenant des capsides exposées à un choc thermique de 72°C  
*Puits 8 :* 15 µl de l'ADN viral provenant des capsides exposées à un choc thermique de 85°C.



#### 4. ÉTUDE DE LA VP1 UP *IN VITRO*

En démontrant que, à l'aide d'un choc thermique à 72°C pendant deux minutes la VP1 up devient accessible à la surface de la capsid virale, il était intéressant de savoir si ce phénomène était observable lors d'une infection.

##### 4.1. Induction de l'externalisation de la VP1 up lors de l'infection virale

L'infection des cellules PT avec les capsides virales du PPV pendant 4, 8 et 12 heures avait pour but de vérifier s'il était possible de voir en fluorescence le domaine spécifique à la VP1. C'est suite à un choc thermique de deux minutes à 72°C effectué sur les capsides avant l'infection et sur les cellules infectées que la présence de particules virales exposant leur VP1 up allait être notée par la fluorescence observée dans les cellules PT infectées.

Les *figures 15, 16 et 17* représentant l'infection virale d'une durée de 4, 8 et 12 heures respectivement, démontre en A) une infection normale. L'anticorps primaire utilisé fut le sérum polyclonal # 416 VP1 up et aucune fluorescence n'est détectée chez ces cellules laissant supposer que la VP1 up n'est pas accessible ou seulement exposée sur un nombre restreint de virions rendant difficile sa détection. Les photos illustrées en B) pour ces mêmes figures sont présentes à titre de témoin où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 reconnaissant la région carboxylée de la protéine VP1 up soit la jonction VP1/VP2 du parvovirus porcin. Des composantes virales sont donc visible pour ces cellules.

En C) pour ces même figures, il est illustré une infection virale où les capsides furent soumises auparavant à un choc thermique de 72°C pendant deux minutes avant l'infection des cellules PT. Le même sérum fut utilisé afin de détecter la VP1 up lors des infections de 4, 8 et 12 heures toutefois sans résultat significatif où un signal de faible

intensité est présent chez toutes les cellules. En D), toujours à titre de témoin, de la fluorescence est observée avec le 3C9-D11-H11.

Finalement, dans ces figures il est représenté en E) une infection virale où le choc thermique fut réalisé après que les cellules furent infectées, c'est-à-dire que le traitement fut effectué sur les cellules infectées avant de procéder à la fixation de celles-ci. À l'aide du sérum # 416 toujours, il est enfin possible d'observer de la fluorescence pour ces cellules. Le choc thermique a donc permis l'exposition de la région unique de la VP1 à la surface des capsides virales la rendant ainsi accessible au sérum. La fluorescence étant plus faible après 4 heures d'infection s'intensifie pour un temps d'infection de 8 heures et 12 heures. Les témoins 3C9-D11-H11 sont illustrés en F) pour ces mêmes figures.

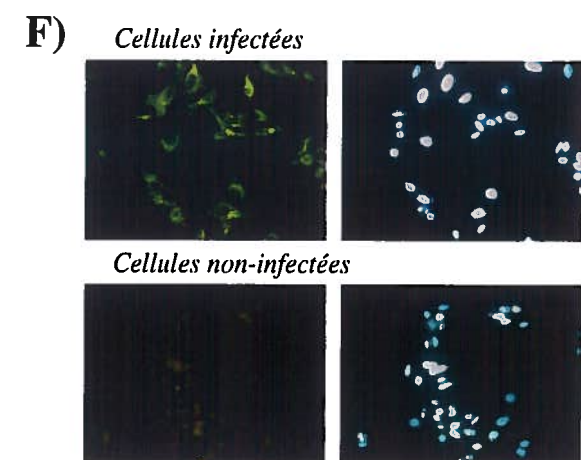
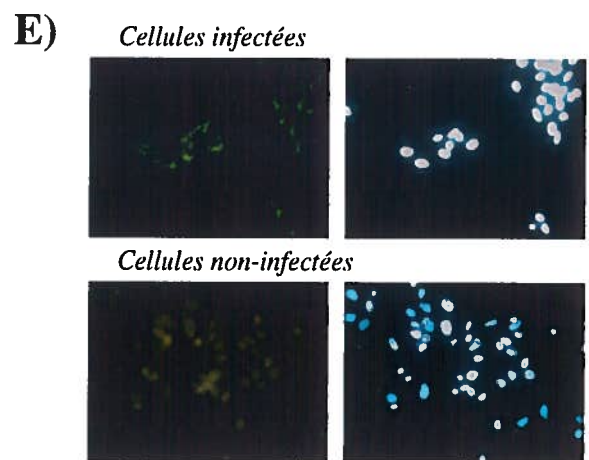
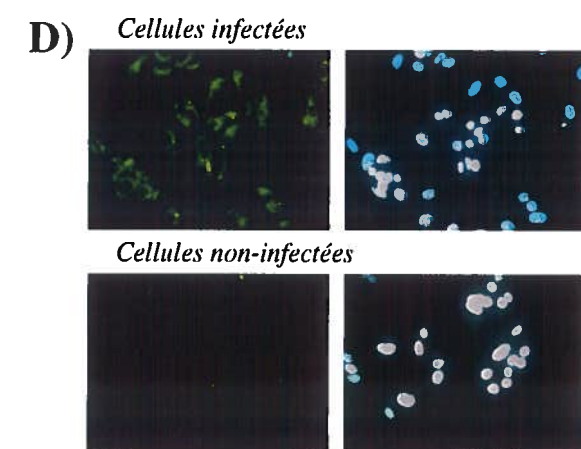
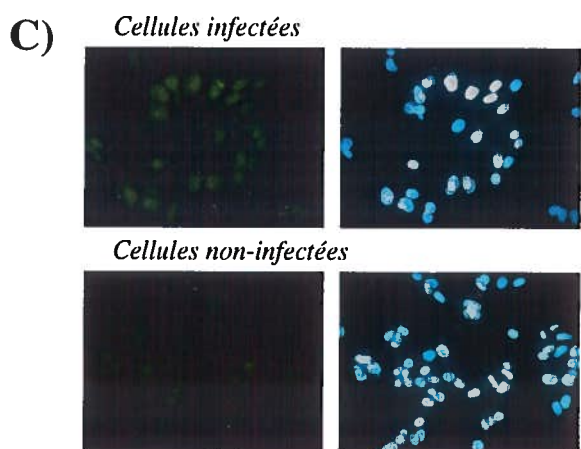
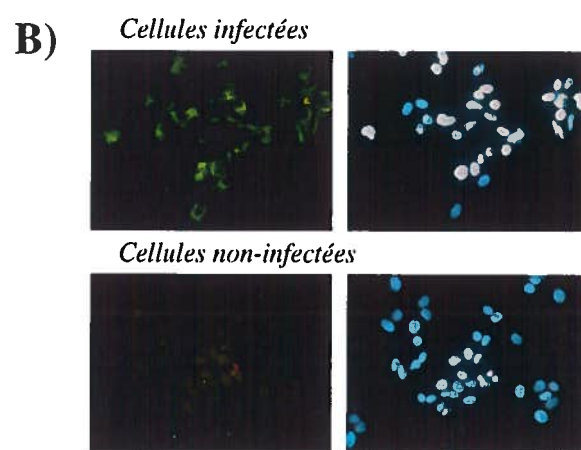
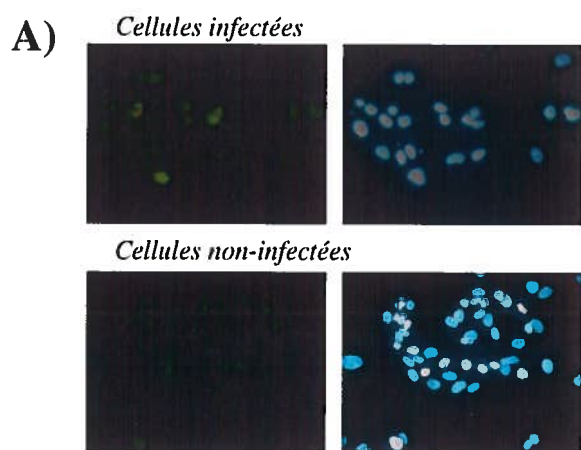
**Figure 15 :** *Observation en microscopie à fluorescence de cellules PT non-infectées et infectées avec le PPV pour une durée de 4 heures*

- A) *Infection normale où par la suite les cellules furent fixées. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif.*
- B) *Témoin positif d'une infection normale où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*
- C) *Choc thermique à 72°C pendant 2 min et ensuite infection des cellules PT avec cette préparation virale pour une durée de 4 heures. Les cellules furent fixées seulement lorsque l'infection fut terminée. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif.*
- D) *Témoin positif (choc thermique sur la préparation virale avant l'infection) où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*
- E) *Infection des cellules PT comme l'infection normale. Suite aux 4 heures d'infection, les cellules infectées furent soumises à un choc thermique de 72°C pendant 2 min avant d'être fixées. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif et ont subi le même traitement que les cellules infectées.*
- F) *Témoin positif (choc thermique 4 heures après l'infection et ce sur les cellules infectées) où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*

*Pour tenter de détecter la VP1 up (A, C, E)), l'anti-sérum de lapin # 416 VP1 up fut utilisé comme anticorps primaire en combinaison avec un anti-IgG de lapin couplé au FITC comme anticorps secondaire.*

*Une coloration au réactif de Hoechst a été effectuée pour visualiser les noyaux des cellules (coloration bleue).*

*Agrandissement : 40X*





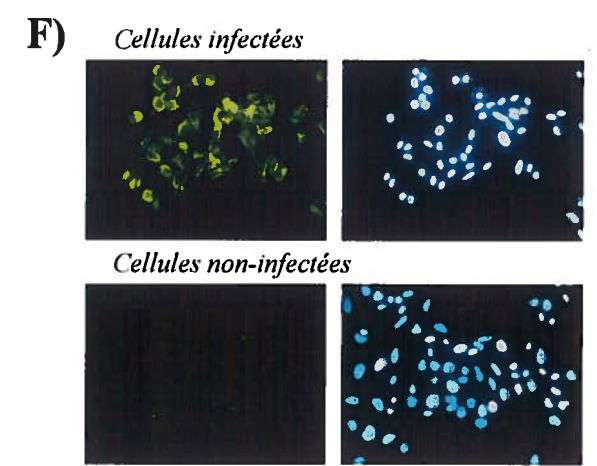
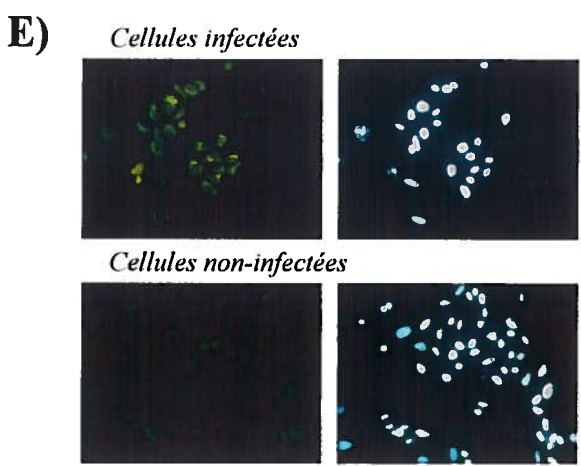
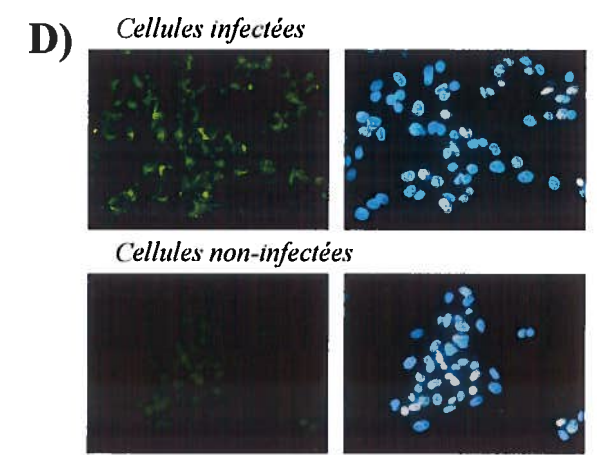
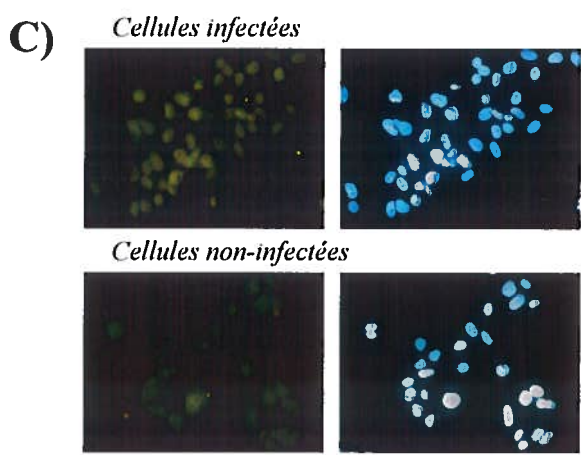
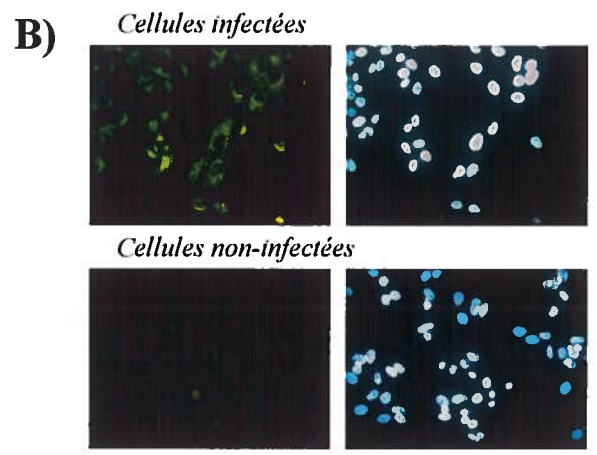
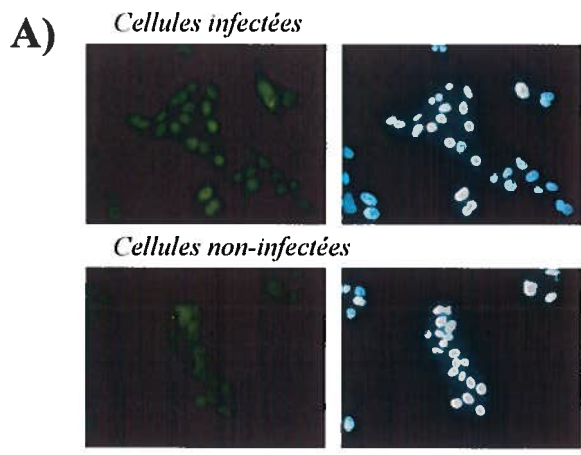
**Figure 16 :** *Observation en microscopie à fluorescence de cellules PT non-infectées et infectées avec le PPV pour une durée de 8 heures*

- A) *Infection normale où par la suite les cellules furent fixées. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif.*
- B) *Témoin positif d'une infection normale où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*
- C) *Choc thermique à 72°C pendant 2 min et ensuite infection des cellules PT avec cette préparation virale pour une durée de 8 heures. Les cellules furent fixées seulement lorsque l'infection fut terminée. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif.*
- D) *Témoin positif (choc thermique sur la préparation virale avant l'infection) où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*
- E) *Infection des cellules PT comme l'infection normale. Suite aux 8 heures d'infection, les cellules infectées furent soumises à un choc thermique de 72°C pendant 2 min avant d'être fixées. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif et ont subi le même traitement que les cellules infectées.*
- F) *Témoin positif (choc thermique 8 heures après l'infection et ce sur les cellules infectées) où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*

*Pour tenter de détecter la VP1 up (A), C), E)), l'anti-sérum de lapin # 416 VP1 up fut utilisé comme anticorps primaire en combinaison avec un anti-IgG de lapin couplé au FITC comme anticorps secondaire.*

*Une coloration au réactif de Hoechst a été effectuée pour visualiser les noyaux des cellules (coloration bleue).*

*Agrandissement : 40X*



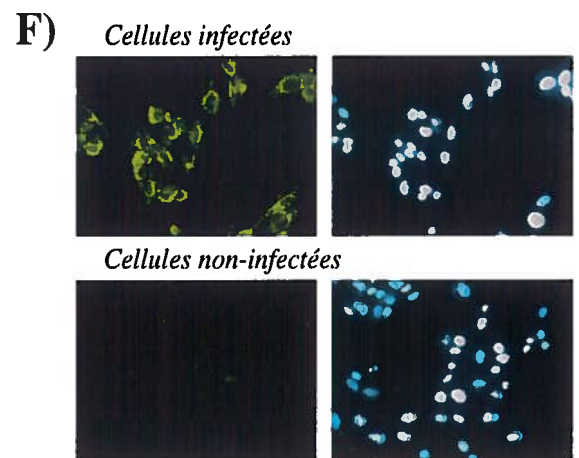
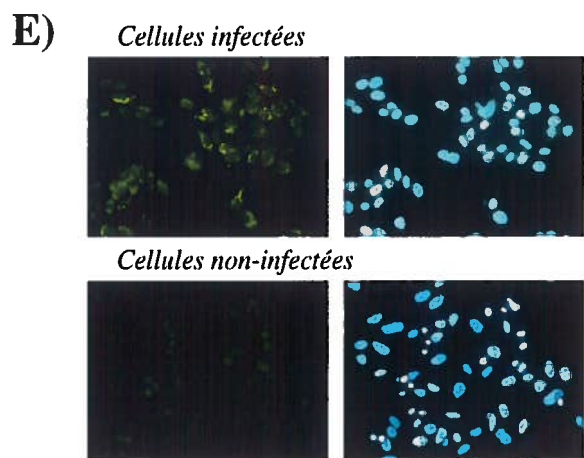
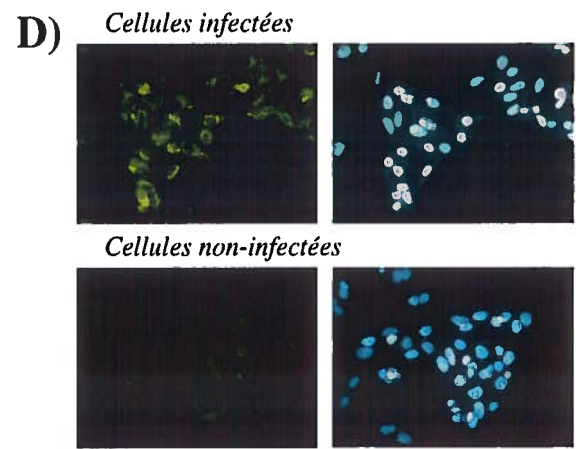
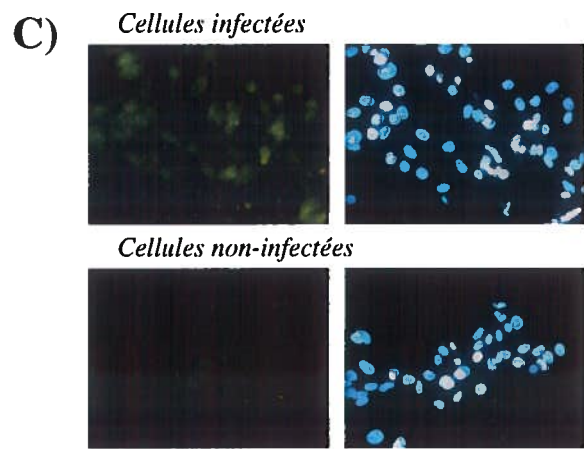
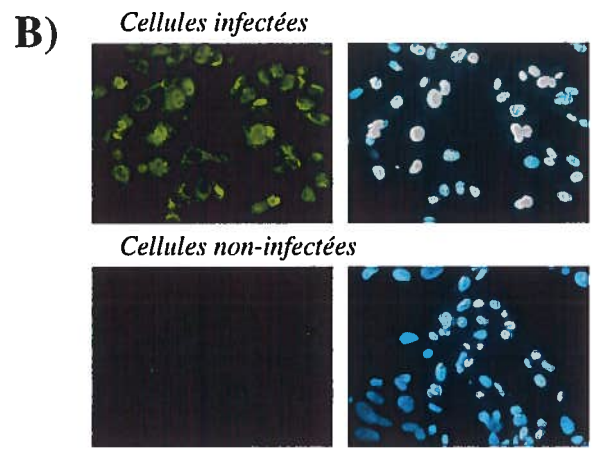
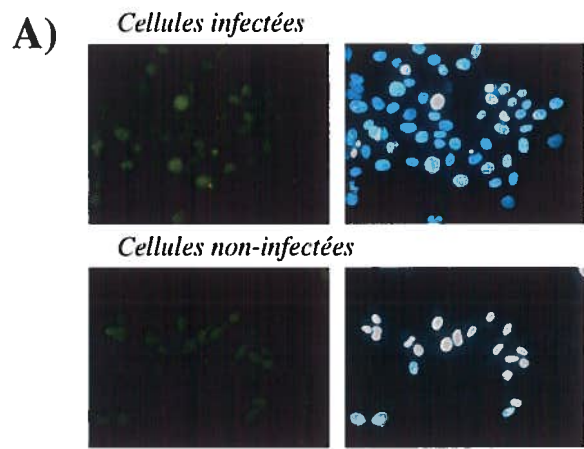
**Figure 17 :** *Observation en microscopie à fluorescence de cellules PT non-infectées et infectées avec le PPV pour une durée de 12 heures*

- G) *Infection normale où par la suite les cellules furent fixées. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif.*
- H) *Témoin positif d'une infection normale où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*
- I) *Choc thermique à 72°C pendant 2 min et ensuite infection des cellules PT avec cette préparation virale pour une durée de 12 heures. Les cellules furent fixées seulement lorsque l'infection fut terminée. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif.*
- J) *Témoin positif (choc thermique sur la préparation virale avant l'infection) où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*
- K) *Infection des cellules PT comme l'infection normale. Suite aux 12 heures d'infection, les cellules infectées furent soumises à un choc thermique de 72°C pendant 2 min avant d'être fixées. Les cellules PT non-infectées ont été utilisées à titre de témoin négatif et ont subi le même traitement que les cellules infectées.*
- L) *Témoin positif (choc thermique 12 heures après l'infection et ce sur les cellules infectées) où l'anticorps primaire utilisé fut le 3C9-D11-H11 en combinaison avec un anti-IgG de souris couplé au FITC comme anticorps secondaire.*

*Pour tenter de détecter la VP1 up (A), C), E)), l'anti-sérum de lapin # 416 VP1 up fut utilisé comme anticorps primaire en combinaison avec un anti-IgG de lapin couplé au FITC comme anticorps secondaire.*

*Une coloration au réactif de Hoechst a été effectuée pour visualiser les noyaux des cellules (coloration bleue).*

*Agrandissement : 40X*



## ***DISCUSSION***

Les études cristallographiques à rayons-X effectuées jusqu'à ce jour ont pu seulement distinguer la partie C-terminale commune aux trois polypeptides structuraux de la capsid virale lors des observations de la structure en trois dimensions de plusieurs parvovirus. La localisation exacte de la région unique N-terminale de la VP1 demeure incertaine chez certains d'entre eux dont fait partie le PPV. Puisque aucune information structurale précise concernant la disposition de ces régions spécifiques à la VP1 ne fut prouvée par ces analyses, il était d'intérêt de se demander si ces séquences uniques sont continuellement exposées à la surface des virions du PPV comme l'un de ses proches soit le parvovirus B19. Si tel n'est pas le cas, de déterminer si elles peuvent être rendues accessibles au niveau de la particule intacte ou seulement suivant une désintégration complète de la capsid virale.

À cette fin, des virions du PPV furent exposés à une source externe d'énergie, expérimentalement sous forme de chaleur, induisant ainsi les capsides à subir des transitions conformationnelles limitées. Ces changements structuraux imiteraient possiblement ceux observés chez le virion infectieux lors de l'infection et sembleraient être requis pour des étapes successives à l'entrée dans la cellule en réponse à un stimulus spécifique (Meyer *et al.*, 1992; Curry *et al.*, 1996). Par l'entremise de deux différents outils soit une banque peptidique exposée en surface de phages et un sérum anti-VP1 up, il fut possible de démontrer la localisation du domaine spécifique à cette protéine à la surface de la capsid du parvovirus porcin.

## **1. ÉTUDE DE L'ACCESSIBILITÉ DES ÉPITOPES SPÉCIFIQUES À LA PROTÉINE VP1**

### **1.1. Librairie phagique**

Les premières analyses de l'accessibilité de la VP1 up furent effectuées à l'aide d'une librairie phagique où des constructions de peptides sont présentées à la surface de la protéine pIII du bactériophage M13. L'utilisation de cette librairie a permis de sélectionner plusieurs clones démontrant une grande affinité envers la région unique de la VP1 et ce, par des essais ELISA. La *figure 8* représentant la spécificité des phages isolés

démontre que les phages 3, 5, 6, 7, 8 et 10 possèdent une forte affinité envers la VP1 up purifiée ainsi que pour la protéine de fusion VP1 up. Le choix de ces phages s'est donc effectué selon la forte réactivité qu'un phage donné avait envers la molécule-cible en premier lieu et envers la protéine de fusion, en second lieu. C'est pour cette raison que les phages 2 et 9 ne furent pas retenus.

Suite à la sélection de ces clones, l'ADN phagique de chacun d'eux a été séquencé de façon à connaître le motif peptidique exposé à leur surface. Le *tableau III* révèle que aucune séquence consensus n'est observée pour les peptides sélectionnés à l'exception des clones 3 et 5, duplicatas du phage 10. L'absence de motif commun pourrait suggérer que ces séquences présentant une forte interaction avec la molécule-cible se lieraient à divers endroits sur la région N-terminale unique de la VP1. Selon Winter et ses collaborateurs (1996), il est possible que des séquences peptidiques variables se lient à une même molécule-cible. Le choix fut donc arrêté sur les phages 6, 7, 8 et 10 pour la poursuite de l'étude.

## **1.2. Exposition de la VP1 up suite à un traitement des capsides à la chaleur**

Une première tentative quant à la détection de la VP1 up à la surface des capsides virales du parvovirus porcine fut réalisée par un essai ELISA. Les quatre clones choisis ont permis de constater que cette région N-terminale n'est pas accessible de l'extérieur des capsides. Cette constatation suppose donc que la VP1 up réside à l'intérieur de la capside du virion. Par contre, comme démontré à la *figure 9*, une exposition des virions à un choc thermique d'une température de 72°C permettrait l'externalisation de ce peptide. En effet, pour cette température, les phages réagissent fortement, comparativement à une température de 55°C et aux capsides natives, à la molécule-cible signifiant probablement une reconnaissance accrue de la VP1 up au niveau de ces capsides.

Ces premiers résultats permettent de croire à une possible ressemblance du PPV avec le CPV et le MVM puisque pour ces virus, la séquence N-terminale unique de leur VP1 fut prouvée à être séquestrée à l'intérieur de leur capside mais pouvait devenir exposée suite à un choc thermique (Cotmore *et al.*, 1999; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002). La

région N-terminale spécifique à la VP1 du PPV serait donc elle aussi séquestrée et résiderait à l'intérieur de la particule virale. Cette observation donnerait alors une explication à l'idée disant qu'aucune activité phospholipase A<sub>2</sub> n'est détectée chez les particules virales nouvellement synthétisées (Zádori *et al.*, 2001).

### **1.3. Protéines phagiques**

#### **1.3.1. Expression des protéines phagiques**

En vue d'une éventuelle étude de la VP1 up en milieu cellulaire lors d'une infection, il était préférable de produire des peptides synthétiques correspondant aux séquences exposées à la surface des phages sélectionnés. Pour ce faire, une synthèse d'oligonucléotides codant pour chacun des peptides appropriés fut effectuée pour ensuite procéder au clonage dans le vecteur pBAD/TOPO thiofusion modifié. Ce système d'expression bactérienne utilisant *E.coli* a permis d'obtenir une quantité appréciable de protéines pour chacun des phages 6, 7, 8 et 10. L'analyse électrophorèse représentée à la *figure 10* permet donc de confirmer la présence des différentes protéines obtenues suite à l'expression et à la purification sur une colonne Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose.

#### **1.4. Affinité des peptides synthétiques envers la région unique de la VP1**

Suite à l'obtention de ces peptides synthétiques, il était de mise de vérifier leur affinité envers la région unique de la VP1 auprès des capsides virales. Un test ELISA fut donc à nouveau effectué utilisant cette fois des capsides natives et d'autres ayant subi un choc thermique à 72°C comme molécules-cibles. Les résultats de cette expérimentation sont représentés à la *figure 11* où les mêmes conclusions que précédemment peuvent être émises. L'accessibilité du domaine unique à la VP1 se voit donc augmentée lorsque les capsides sont soumises à un stimulus externe tel que la chaleur. Il est possible aussi de voir que l'interaction protéine-protéine est plus importante dans ce cas-ci due probablement à l'absence d'encombrement stérique retrouvé avec les phages.



Aucun résultat concluant ne fut obtenu en ce qui a trait à la détection de la VP1 up par ces peptides synthétiques lors d'une infection. La présence constante d'un bruit de fond possiblement due au sérum polyclonal utilisé en combinaison avec ces protéines ne permettait pas de distinguer clairement une réaction positive d'une négative. C'est pour ces raisons qu'il ne fut pas d'intérêt de présenter ces résultats.

## **2. CARACTÉRISATION DE L'INTÉGRITÉ DE LA CAPSIDE DU PPV**

### **2.1. Exposition du domaine spécifique à la VP1 et détection par un anti-VP1 up**

Comme les essais effectués en milieu cellulaire utilisant les protéines phagiques furent sans succès, un sérum de lapin polyclonal anti-VP1 up fut utilisé. Cet anti-sérum dirigé contre les séquences amino-terminales de la VP1 a été utilisé aussi afin d'explorer l'accessibilité de la VP1 up des virions intacts du PPV. Les études effectuées avec ce sérum démontrent à la *figure 12* que la région unique à la VP1 n'est pas exposée sur les capsides natives mais le devient suite à un traitement des capsides à la chaleur. On note aussi que lors d'un traitement à 85°C, la presque totalité des VP1 up semble exposée à la surface des virions vu la très forte interaction du sérum observée avec ces capsides. Une hausse de la température augmente donc la détection de la VP1 up par le sérum indiquant qu'une brève exposition à des températures supérieures à 55°C induit une transition conformationnelle dans la population virale (Cotmore *et al.*, 1999). Ainsi, les séquences spécifiques à la VP1 deviennent plus facilement accessibles extérieurement.

#### **2.1.1. Titre d'infectivité virale**

Parallèlement à l'essai ELISA, le titre d'infectivité virale s'est effectué pour chacun de ces cas, c'est-à-dire que suite aux différents chocs thermiques de 55°C, 65°C, 72°C et 85°C, des cellules permissives furent infectées avec ces diverses capsides. Le titre d'infectivité des virions ayant subi ces divers traitements obtenu suite au dénombrement des cellules infectées en observant les noyaux fluorescents est présenté à la *figure 12* où il

est possible de constater que l'infectivité virale a tendance à diminuer plus la température du choc thermique augmente. De plus, la portion de virions infectieux est considérablement réduite lors d'un choc thermique de 85°C puisque le titre pour cette population est relativement faible.

Ceci suggère que plus les virions exposent à leur surface la région N-terminale de leur VP1, plus ils voient leur infectivité diminuer. L'inactivation de l'infectivité virale correspondrait donc avec la proportion de virions exposant ces séquences spécifiques à leur surface (Cotmore *et al.*, 1999).

## 2.2. Observation de l'intégrité des capsides suite à divers chocs thermiques

Une fois la présence de la VP1 up à la surface de la capsidite suite à un choc thermique bien établie, la prochaine étape consistait à confirmer si ce domaine est exposé par externalisation d'une capsidite intacte ou simplement parce que la capsidite est complètement dissociée. Pour évaluer l'intégrité de la particule virale suivant un choc thermique, les virions furent exposés à des températures variables soit 55°C, 65°C, 72°C et 85°C. L'analyse des capsides virales s'est réalisée en microscopie électronique par un essai d'immunodétection indirect à l'or colloïdal.

Les résultats présentés à la *figure 13* appuient les observations faites par Cotmore et ses collaborateurs (1999) démontrant qu'à des températures allant jusqu'à 70-72°C, les polypeptides du virion demeurent majoritairement associés en une particule intacte tandis qu'à des températures plus élevées comme 85°C, les épitopes structuraux sont rapidement perdus vu la dissociation de la capsidite en ses composantes polypeptidiques. La structure des particules virales demeure essentiellement intacte jusqu'à une température de 72°C. Au-dessus de cette température, le choc thermique induira une réorganisation structurale majeure. De plus, par l'entremise du sérum de lapin polyclonal anti-VP1 up il fut possible de confirmer les observations précédentes. C'est-à-dire que la réactivité de ces anticorps dirigés contre les déterminants structuraux uniques à la VP1 est presque nulle chez les capsides natives et s'amplifie lorsque les capsides sont exposées à un choc thermique. Il est évident qu'on ne peut exclure le fait qu'il puisse y avoir des capsides dissociées à une

température de 72°C par exemple, mais en observant l'emplacement des molécules d'or colloïdal soit à proximité et même très près des capsides, tout indique que la VP1 up est aussi accessible au niveau de capsides intactes.

### 3. ACCESSIBILITÉ DE L'ADN VIRAL À L'ENVIRONNEMENT EXTERNE

Malgré l'intégrité apparente de la capside, il était intéressant de vérifier l'accessibilité de l'ADN viral à l'environnement externe afin de savoir si un lien relie changement conformationnel, externalisation de la VP1 up et dénudation du génome viral. Suite à divers chocs thermiques, les particules virales furent mises en présence de DNase pour ensuite évaluer sur gel d'agarose la quantité d'ADN viral qui fut touchée par cet enzyme en comparaison avec une capside native. La *figure 14* démontre que l'ADN est libéré à faible niveau lors d'un choc thermique des capsides à 55°C mais devient totalement exposé lors d'un traitement à 85°C, c'est-à-dire lorsque les capsides sont majoritairement désintégrées. Le génome viral devient accessible aux enzymes présents dans l'environnement externe dans une proportion en augmentant suivant l'échelle de température croissante suggérant que les changements conformationnels qui exposent la VP1 up permettent probablement aussi l'accès au génome. Bien que la région unique de la VP1 des capsides du PPV fut exposée par choc thermique entre 55°C et 72°C et que l'ADN viral a aussi été exposé sous des conditions similaires, ces résultats ne prouvent pas nécessairement que ces événements sont dû aux mêmes changements structuraux dans la capside. Dans les études sur le MVM, la libération de la VP1 up ainsi que de l'ADN a semblé être étroitement liée résultant probablement du même stimulus (Cotmore *et al.*, 1999).

Il est donc tentant de spéculer que les particules virales subissant un choc thermique d'une température supérieure à 55°C induirait une flexibilité encore plus extrême de la part du canal cylindrique situé à l'axe de symétrie d'ordre 5, résultant des transitions conformationnelles qui rendent les séquences spécifiques à la VP1 accessibles à la surface et finalement, permettent l'émission du génome.

#### 4. ÉTUDE DE LA VP1 UP *IN VITRO*

##### 4.1. Induction de l'externalisation de la VP1 up lors de l'infection virale

Le dernier point de ce travail fut de vérifier dans un premier temps, s'il était possible de détecter la VP1 up lors d'une infection virale normale et ce, à l'aide du sérum dirigé contre cette séquence spécifique. Dans un deuxième temps, de vérifier si un choc thermique à 72°C pendant deux minutes soumis aux cellules infectées pouvait induire l'externalisation de la VP1 up permettant ainsi de la détecter à l'aide du même sérum.

Les figures 15, 16 et 17 présentent en A) et B) des photos illustrant une infection dite normale puisque aucun traitement ne fut appliqué où en A) la détection de la VP1 up fut tentée par l'utilisation du sérum anti-VP1 up comme anticorps primaire et en B), l'utilisation de l'anticorps monoclonal 3C9-D11-H11 comme témoin positif. Il est possible d'observer pour le témoin positif la présence de virus dans les cellules. Par contre, on note l'absence de VP1 up détectable par le sérum lors de cette expérimentation supposant que soit le domaine d'intérêt n'est pas accessible lors d'une infection de 4, 8 ou 12 heures ou dû au manque de spécificité du sérum. La raison la plus plausible demeure tout de même que dans une préparation virale très peu de virus infectieux s'y retrouvent et donc un faible nombre de virions présents en milieu cellulaire vont exposer la séquence N-terminale de leur VP1 à la surface de leur capsid. Ce qui diminue la possibilité de détecter facilement cette exposition à la surface de ces virus puisque la quantité de VP1 up pouvant être accessible est minime.

Ces mêmes figures illustrant en C) une infection où les capsides virales furent soumises auparavant à un choc thermique à 72°C et en D), le témoin positif toujours, ne démontrent aucune fluorescence significative en C) comparativement au témoin. Un bruit de fond important est par contre observé pouvant semer le doute sur la pertinence d'associer cette positivité observée en C) aux séquences des extrémités N-terminales de la VP1. Ces résultats ne furent pas très concluants et les efforts ont été vains quant à la tentative de démontrer que lors d'un choc thermique avant une infection, les virus exposant leur VP1 up ne sont pas infectieux. Ceci pourrait supposer que selon la

température et la durée à laquelle le choc thermique fut effectué, il y a une proportion de la population virale qui demeure toujours infectieux.

Finalement, les illustrations retrouvées en E) pour ces figures représentent une infection virale où le choc thermique a été effectué après que les cellules furent infectées par le PPV. L'anticorps couplé à la fluorescéine démontre alors qu'après 4 heures d'incubation suivi du choc thermique, la VP1 up est faiblement détectée tandis qu'elle l'est davantage lors d'une infection de 8 heures et 12 heures. En effet, des séquences spécifiques à la VP1 sont présentes à la surface de capsides se trouvant majoritairement autour du noyau de certaines cellules. La coloration spécifique à la VP1 up observée après 4 heures est augmentée particulièrement suite à 8 ou 12 heures d'infection. Les témoins positifs sont illustrés en F).

Il est donc possible d'induire l'exposition de ces peptides uniques à la surface des capsides virales à l'intérieur des cellules par l'entremise d'un choc thermique à 72°C pendant deux minutes. Même si ce choc thermique n'est pas un phénomène naturel en soit observé en milieu physiologique, il en demeure pas moins que l'idée d'un stimulus externe pouvant induire l'externalisation de la VP1 up à la surface des virions lors d'une infection virale semble réaliste.

Éventuellement, il serait intéressant de déterminer le stimulus naturel qui engendre l'exposition du domaine unique de la VP1 à la surface des capsides du PPV ainsi que la cible enzymatique de la phospholipase A<sub>2</sub>. Il faudrait par contre dans un premier temps procéder à l'élaboration d'anticorps monoclonaux envers la VP1 up. À l'aide de ces anticorps, il serait possible de suivre l'infection virale et ainsi tenter de déterminer à quel moment et où exactement l'externalisation de cette région spécifique a lieu. De plus, la particule virale ayant subi un choc thermique pourrait être mise en présence de ces anticorps monoclonaux pour ensuite procéder à une infection afin de vérifier s'il y a ou non présence d'une infection productive. L'observation possible d'une non-infection pourrait ainsi amener l'idée de développer un anti-viraux ciblant la VP1 up.

## ***CONCLUSION***

La présente étude fut réalisée dans l'optique d'en connaître davantage sur la protéine structurale VP1 et ce, plus spécifiquement sur sa région unique N-terminale. Les informations concernant la localisation exacte de cet épitope au niveau de la capsidie du parvovirus porcine demeuraient incertaines jusqu'à présent et n'ont pas vraiment été compilées. Plusieurs travaux réalisés chez différents parvovirus indiquent que la localisation de ce peptide spécifique diffère d'une espèce à l'autre.

Les résultats obtenus lors de ce projet démontrent que la séquence spécifique N-terminale de la VP1 réside bel et bien à l'intérieur de la capsidie native et n'est pas accessible à l'environnement externe jusqu'à ce qu'un stimulus externe induise son externalisation suite à un changement conformationnel du virion. En effet, à l'aide de l'affichage de phages, des protéines phagiques ainsi que d'un sérum polyclonal dirigé contre ce domaine unique, cette hypothèse fut consolidée. De plus, l'analyse en microscopie électronique de l'essai d'immunomarquage indirect à l'or colloïdal appuie l'idée que l'externalisation de la partie unique à la VP1 peut s'effectuer à la surface d'une capsidie intacte. En milieu cellulaire, comme il fut possible d'induire l'exposition de ces peptides spécifiques à la surface des virions présents et ce, dans certaines cellules, la perspective de l'existence d'un stimulus externe est retenue. Finalement, lorsque les particules virales exposent de plus en plus leurs VP1 up à leur surface, l'infektivité virale est relativement réduite supposant l'implication de ces séquences dans l'obtention d'une infection productive.

En définitive, ces travaux ont ouvert la voie vers d'autres expérimentations qui pourront être réalisées afin de déterminer le stimulus externe naturel qui engendre l'exposition du domaine unique à la VP1 ainsi qu'éventuellement la cible enzymatique de la phospholipase  $A_2$  présente dans cette séquence. De plus, des recherches plus approfondies concernant les étapes précoces du cycle viral du PPV sont nécessaires afin de déterminer exactement le rôle exact de la VP1 up et de son motif PLA<sub>2</sub> lors d'une infection. Cette caractérisation permettra à plus long terme d'ouvrir le chemin vers une nouvelle classe d'anti-viraux ciblant cette région unique.

# ***BIBLIOGRAPHIE***



- AGBANDJE, M., S. Kajigaya, R. McKenna, N.S. Young, M.G. Rossmann, 1994. «*The Structure of Human Parvovirus B19 at 8Å Resolution*». Virology. Vol. 203, no. 1, p. 106-115.
- AGBANDJE, M., C.R. Parrish, M.G. Rossmann, 1995. «*The Structure of Parvoviruses*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 299-309.
- AGBANDJE-MCKENNA, M., A.L. Lamas-Saiz, F. Wang, P. Tattersall, M.G. Rossmann, 1998. «*Functional Implications of the Structure of the Murine Parvovirus, Minute Virus of Mice*». Structure. Vol. 6, no. 11, p. 1369-1381.
- ARELLA, M., S. Garzon, J. Bergeron, P. Tijssen, 1990. «*Physicochemical Properties, Production, and Purification of Parvoviruses*». Handbook of Parvoviruses. Vol. I, chap. 2. (Tijssen, P., éd.) CRC Press, Boca Raton, Fl, p. 11-30.
- AUSUBEL, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, K. Struhl, 1994. Current Protocols in Molecular Biology. New York, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- BALSINDE, J., M.A. Balboa, P.A. Insel, E.A. Dennis, 1999. «*Regulation and Inhibition of Phospholipase A<sub>2</sub>*». Annual Review of Pharmacological Toxicology. Vol. 39, p. 175-189.
- BARBIS, D.P., S.F. Chang, C.R. Parrish, 1992. «*Mutations Adjacent to the Dimple of the Canine Parvovirus Capsid Structure Affect Sialic Acid Binding*». Virology. Vol. 191, no. 1, p. 301-308.
- BASAK, S., R.W. Compans, 1989. «*Polarized Entry of Canine Parvovirus in an Epithelial Cell Line*». Journal of Virology. Vol. 63, no. 7, p. 3164-3167.

BASAK, S., H. Turner, 1992. «*Infectious Entry Pathway for Canine Parvovirus*». Virology. Vol. 186, no. 2, p. 368-376.

BERGERON, J., J. Menezes, P. Tijssen, 1993. «*Genomic Organization and Mapping of Transcription and Translation Products of the NADL-2 Strain of Porcine Parvovirus*». Virology. Vol. 197, p. 86-98.

BERGERON, J., B. Hébert, P. Tijssen, 1996. «*Genome Organization of the Kresse Strain of Porcine Parvovirus: Identification of the Allotropic Determinant and Comparison with Those of NADL-2 and Field Isolates*». Journal of Virology. Vol. 70, p. 2508-2515.

BOURGUIGNON, G.J., P.J. Tattersall, D.C. Ward, 1976. «*DNA of Minute Virus of Mice: Self-Priming, Non-Permuted, Single-Stranded Genome with a 5'-Terminal Hairpin Duplex*». Journal of Virology. Vol. 20, no. 1, p. 290-306.

BROWN, D.D., L.A. Salzman, 1984. «*Sequence homology between the structural proteins of Kilham rat virus*». Journal of Virology. Vol. 49, no. 3, p. 1018-1020.

CHANG, S.F., J.Y. Sgro, C.R. Parrish, 1992. «*Multiple Amino Acids in the Capsid Structure of Canine Parvovirus Coordinately Determine the Canine Host Range and Specific Antigenic and Hemagglutination Properties*». Journal of Virology. Vol. 66, no. 12, p. 6858-6867.

CHAPMAN, M.S., M.G. Rossmann, 1993. «*Structure, Sequence, and Function Correlations Among Parvoviruses*». Virology. Vol. 194, no. 2, p. 491-508.

CHOI, C.S., T.W. Molitor, H.S. Joo, R. Gunther, 1987. «*Pathogenicity of a Skin Isolate of Porcine Parvovirus in Swine Fetuses*». Veterinarian Microbiology. Vol. 15, no. 1-2, p. 19-29.

CLINTON, G.M., M. Hayashi, 1975. «*The Parvovirus MVM: Particles with Altered Structural Proteins*». Virology. Vol. 66, no. 1, p. 163-168.

COTMORE, S.F., P. Tattersall, 1987. «*The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates*». Advances in Virus Research. Vol. 33 p. 91-174.

COTMORE, S.F., P. Tattersall, 1989. «*A Genome-Linked Copy of the NS-1 Polypeptide is Located on the Outside of Infectious Parvovirus Particles*». Journal of Virology. Vol. 63, no. 9, p. 3902-3911.

COTMORE, S.F., P. Tattersall, 1995. «*DNA Replication in the Autonomous Parvoviruses*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 271-281.

COTMORE, S.F., A.M. D'Abramo Jr., C.M. Ticknor, P. Tattersall, 1999. «*Controlled Conformational Transitions in the MVM Virions Expose the VP1 N-Terminus and Viral Genome without Particle Disassembly*». Virology. Vol. 254, p. 169-181.

CURRY, S., M. Chow, J.M. Hogle, 1996. «*The Poliovirus 135S Particle is Infectious*». Journal of Virology. Vol. 70, p. 7125-7131.

DENNIS, E.A., 1997. «*The Growing Phospholipase A<sub>2</sub> Superfamily of Signal Transduction Enzymes*». TIBS 22. P. 1-2.

DOERIG, C., B. Hirt, P. Beard, J.-P. Antonietti, 1988. «*Minute virus of mice non-structural protein NS-1 is necessary and sufficient for trans-activation of the viral P39 promoter*». Journal of General Virology. Vol. 69, no. 10, p. 2563-2573.

DOERIG, C., B. Hirt, J.-P. Antonietti, P. Beard, 1990. «*Nonstructural Protein of Parvovirus B19 and Minute Virus of Mice Controls Transcription*». Journal of Virology. Vol. 64, p. 387-396.

DORSCH, S., G. Liebisch, B. Kaufmann, P. von Landenberg, J.H. Hoffmann, W. Drobnik, S. Modrow, 2002. «*The VP1 Unique Region of Parvovirus B19 and its Constituent Phospholipase A<sub>2</sub>-Like Activity*». Journal of Virology. Vol. 76, no. 4, p. 2014-2018.

DOUAR, A.M., K. Poulard, D. Stockholm, O. Danos, 2001. «*Intracellular Trafficking of Adeno-Associated Virus Vectors: Routing to the Late Endosomal Compartment and Proteasome Degradation*». Journal of Virology. Vol. 75, no. 4, p. 1824-1833.

DUNNE, H.W., J.C. Gobble, J.R. Hokanson, D.C. Kradel, G.R. Bubash, 1965. «*Porcine Reproductive Failure Associated with a Newly Defined "SMEDI" Group of Picornavirus*». American Journal of Veterinary Research. Vol. 26, no. 115, p. 1284-1290.

GARDINER, E.M., P. Tattersall, 1988. «*Evidence that Developmentally Regulated Control of Gene Expression by a Parvoviral Allotropic Determinant is Particle Mediated*». Journal of Virology. Vol. 62, no. 5, p. 1713-1722.

GIROD, A., C.E. Wobus, Z. Zádori, M. Ried, K. Leike, P. Tijssen, J.A. Kleinschmidt, M. Hallek, 2002. «*The VP1 Capsid Protein of Adeno-Associated Virus Type 2 is Carrying a Phospholipase A<sub>2</sub> Domain Required for Virus Infectivity*». Journal of General Virology. Vol. 83, p. 973-978.

HARDING, M.J., T.W. Molitor, 1992. «*A Monoclonal Antibody which Recognizes Cell Surface Antigen and Inhibits Porcine Parvovirus Replication*». Archives of Virology. Vol. 123, no. 3-4, p. 323-333.

HEEGAARD, E.D., K.E. BROWN, 2002. «*Human Parvovirus B19*». Clinical Microbiology Reviews. Vol. 15, no. 3, p. 485-505.

- JACOBY, R.O., L.J. Ball-Goodrich, D.G. Besselsen, M.D. McKisic, L.K. Riley, A.L. Smith, 1996. «*Rodent Parvovirus Infections*». Laboratory Animal Sciences. Vol. 46, p. 370-380.
- JOO, H.S., C.R. Donaldson-Wood, R.H. Johnson, 1976. «*Observations on the Pathogenesis of Porcine Parvovirus Infection*». Archives of Virology. Vol. 51, p. 123-129.
- KRESSE, J.I., W.D. Taylor, W.W. Stewart, K.A. Eernisse, 1985. «*Parvovirus Infection in Pigs with Necrotic and Vesicle-Like Lesions*». Veterinary Microbiology. Vol. 10, no. 6, p. 525-531.
- LI, X., S.L. Rhode III, 1991. «*Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro*». Virology. Vol. 184, no. 1, p. 117-130.
- LI, X., S.L. Rhode III, 1993. «*The parvovirus H-1 NS2 protein affects viral gene expression through sequences in the 3' untranslated region*». Virology. Vol. 194, no. 1, p. 10-19.
- LOIZOU, S., J.K. Cazabon, M.J. Walport, D. Tait, A.K. So, 1997. «*Similarities of specificity and cofactor dependence in serum antiphospholipid antibodies from patients with human parvovirus B19 infection and from those with systemic lupus erythematosus*». Arthritis Rheumatism. Vol. 40, p. 103-108.
- LOMBARDO, E., J.C. Ramirez, M. Agbandje-McKenna, J.M. Almendral, 2000. «*A Beta-Stranded Motif Drives Capsid Protein Oligomers of the Parvovirus of Mice into the Nucleus for Viral Assembly*». Journal of Virology. Vol. 74, no. 8, p. 3804-3814.

LUNARDI, C., M. Tiso, L. Borgato, L. Nanni, R. Millo, G. De Sandre, A.B. Severi, A. Puccetti, 1998. «*Chronic Parvovirus B19 Infection Induces the Production of Anti-Virus Antibodies with Autoantigen Binding Properties*». European Journal of Immunology. Vol. 28, p. 936-948.

MENGELING, W.L., R.C. Cutlip, 1976. «*Reproductive Disease Experimentally Induced by Exposing Pregnant Gilts to Porcine Parvovirus*». American Journal of Veterinary Research. Vol. 37, no. 12, p. 1393-1400.

MENGELING, W.L., J.F. Ridpath, A.C. Vorwald, 1988. «*Size and Antigenic Comparisons Among the Structural Proteins of Selected Autonomous Parvoviruses*». Journal of General Virology. Vol. 69, pt. 4, p. 825-837.

MEYER, W.J., S. Gidwitz, V.K. Ayers, R.J. Schoepp, R.E. Johnston, 1992. «*Conformational Alteration of Sindbis Virion Glycoproteins Induced by Heat, Reducing Agents, or Low pH*». Journal of Virology. Vol. 66, p. 3504-3513.

MOLITOR, T.W., H.S. Joo, M.S. Collett, 1985. «*Identification and Characterization of a Porcine Parvovirus Nonstructural Polypeptide*». Journal of Virology. Vol. 55, p. 554-559.

NAEGER, L.K., J. Cater, D.J. Pintel, 1990. «*The Small Nonstructural Protein (NS2) of the Parvovirus Minute Virus of Mice is Required for Efficient DNA Replication and Infectious Virus Production in a Cell-Type-Specific Manner*». Journal of Virology. Vol. 64, no. 12, p. 6166-6175.

NAEGER, L.K., N. Salomé, D.J. Pintel, 1993. «*NS2 is Required for Efficient Translation of Viral mRNA in Minute Virus of Mice-Infected Murine Cells*». Journal of Virology. Vol. 67, p. 1034-1043.

NAIDES, S.J., 1998. «*Rheumatic Manifestations of Parvovirus B19 Infection*». Rheumatic Disease Clinics of North America. Vol. 24, no. 2, p. 375-401.

ORAVEERAKUL, K., C.-S. Choi, T.W. Molitor, 1992. «*Restriction of Porcine Parvovirus Replication in Nonpermissive Cells*». Journal of Virology. Vol. 66, p. 715-722.

PARKER, J.S.L., C.R. Parrish, 2000. «*Cellular Uptake and Infection by Canine Parvovirus Involves Rapid Dynamin-Regulated Clathrin-Mediated Endocytosis, Followed by Slower Intracellular Trafficking*». Journal of Virology. Vol. 74, no. 4, p. 1919-1930.

PARKER, J.S., W.J. Murphy, D. Wang, S.J. O'Brien, C.R. Parrish, 2001. «*Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors to Bind, Enter, and Infect Cells*». Journal of Virology. Vol. 75, no. 8, p. 3896-3902.

PARRISH, C.R., 1991. «*Mapping Specific Functions in the Capsid Structure of Canine Parvovirus and Feline Panleukopenia Virus Using Infectious Plasmid Clones*». Virology. Vol. 183, no. 1, p. 195-205.

PINTEL, D.J., A. Gersappe, D. Haut, J. Pearson, 1995. «*Determinants that govern alternative splicing of parvovirus pre-mRNAs*». Seminars in Virology. Vol. 6, no. 5, p. 283-290.

PRUZANSKI, W., P. Vadas, 1991. «*Phospholipase A<sub>2</sub> - a Mediator between Proximal and Distal Effectors of Inflammation*». Immunology Today. Vol. 12, no. 5, p. 143-146.

REYNOLDS, L.J., L.L. Hughes, E.A. Dennis, 1992. «*Analysis of Human Synovial Fluid Phospholipase A<sub>2</sub> on Short Chain Phosphatidylcholine-Mixed Micelles: Development of a Spectrophotometric Assay Suitable for a Microtiterplate Reader*». Analytical Biochemistry. Vol. 204, p. 190-197.

RIDPATH, J.F., W.L. Mengeling, 1988. «*Uptake of Porcine Parvovirus into Host and Nonhost Cells Suggests Host Specificity is Determined by Intracellular Factors*». Virus Research. Vol. 10, no. 1, p. 17-27.

ROSENFELD, S.J., K. Yoshimoto, S. Kajigaya, S. Anderson, N.S. Young, A. Field, P. Warren, G. Bansal, M.S. Collett, 1992. «*Unique Region of the Minor Capsid Protein of Human Parvovirus B19 is Exposed on the Virion Surface*». Journal of Clinical Investigation. Vol. 89, no. 6, p. 2023-2029.

SIEGL, G., 1984. «*Biology of pathogenicity of autonomous parvovirus*» The Parvoviruses. K.I. Berns (éd.), New York, Plenum.

SIEGL, G., R.C. Bates, K.I. Berns, B.J. Carter, D.C. Kelly, E. Kurstak, P. Tattersall, 1985. «*Characteristics and Taxonomy of Parvoviridae*». Intervirology. Vol. 23, no. 2, p. 61-73.

SIMPSON, A.A., B. Hébert, G.M. Sullivan, C.R. Parrish, Z. Zádori, P. Tijssen, M.G. Rossmann, 2002. «*The Structure of Porcine Parvovirus: Comparison with Related Viruses*». Journal of Molecular Biology. Vol. 315, no. 5, p. 1189-1198.

SUIKKANEN, S., K. Saajarvi, J. Hirsimaki, O. Valilehto, H. Reunanen, M. Vihinen-Ranta, M. Vuento, 2002. «*Role of Recycling Endosomes and Lysosomes in Dynein-Dependent Entry of Canine Parvovirus*». Journal of Virology. Vol. 76, no. 9, p. 4401-4411.



TATTERSALL, P., P.J. Cawte, A.J. Shatkin, D.C. Ward, 1976. «*Three Structural Polypeptides Coded for by Minute Virus of Mice, a Parvovirus*». Journal of Virology. Vol. 20, no. 1, p. 273-289.

TATTERSALL, P., A.J. Shatkin, D.C. Ward, 1977. «*Sequence Homology Between the Structural Polypeptides of Minute Virus of Mice*». Journal of Molecular Biology. Vol. 111, no. 4, p. 375-394.

TATTERSALL, P., S. Cotmore, 1988. «*Parvovirus and Human Diseases*». J.R. Pattison (éd.). Boca Raton, CRC Press.

TIJSSEN, P., 1990. «*Introduction: Parvoviruses*». Handbook of Parvoviruses. Vol. I, chap. 1. (Tijssen, P., éd.) CRC Press, Boca Raton, FL, p. 3-11.

TIJSSEN, P., J. Bergeron, R. Dubuc, B. Hébert, 1995. «*Minor Genetic Changes Among Porcine Parvovirus Groups are Responsible for Major Distinguishing Biological Properties*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 319-328.

TIJSSEN, P., J. Bergeron, 1999. «*Parvoviruses: Rodents, Pigs, Cattle and Waterfowl*». Encyclopedia of Virology. Academic Press, San Diego, CA, p. 1167-1175.

TISCHFIELD, J.A., 1997. «*A Reassessment of the Low Molecular Weight Phospholipase A<sub>2</sub> Gene Family in Mammals*». The Journal of Biological Chemistry. Vol. 272, no. 28, p. 17247-17250.

TRUYEN, U., C.R. Parrish, 1992. «*Canine and feline host ranges of canine parvovirus and feline panleukopenia virus: distinct host cell tropisms of each virus in vitro and in vivo*». Journal of Virology. Vol. 66, no. 9, p. 5399-5408.

TSAO, J., M.S. Chapman, M. Agbandje, W. Keller, K. Smith, H. Wu, M. Luo, T.J. Smith, M.G. Rossmann, R.W. Compans, C.R. Parrish, 1991. «*The Three-Dimensional Structure of Canine Parvovirus and its Functional Implications*». Science. Vol. 251, no. 5000, p. 1456-1464.

TULLIS, G.E., L.R. Burger, D.J. Pintel, 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*». Journal of Virology. Vol. 67, no. 1, p. 131-141.

UTHMAN, I.W., A.E. Gharavi, 2002. «*Viral Infections and Antiphospholipid Antibodies*». Seminars in Arthritis and Rheumatism. Vol. 31, no. 4, p. 256-263.

VANACKER, J.-M., J. Rommelaere, 1995. «*Nonstructural Proteins of Autonomous Parvoviruses: from Cellular Effects to Molecular Mechanisms*». Seminars in Virology. Vol. 6, p. 291-297.

VAN REGENMORTEL, M.H.V., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle, R.B. Wickner, 2000. «*Virus Taxonomy: The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*». San Diego, Academic Press.

VASUDEVACHARYA, J., R.W. Compans, 1992. «*The NS and Capsid Genes Determine the Host Range of Porcine Parvovirus*». Virology. Vol. 187, no. 2, p. 515-524.

VIHINEN-RANTA, M., L. Kakkola, A. Kalela, P. Vilja, M. Vuento, 1997. «*Characterization of a Nuclear Localization Signal of Canine Parvovirus Capsid Proteins*». European Journal of Biochemistry. Vol. 250, no. 2, p. 389-394.

- VIHINEN-RANTA, M., A. Kalela, P. Makinen, L. Kakkola, V. Majomaki, M. Vuento, 1998. «*Intracellular Route of Canine Parvovirus Entry*». Journal of Virology. Vol. 72, no. 1, p. 802-806.
- VIHINEN-RANTA, M., D. Wang, W.S. Weichert, C.R. Parrish, 2002. «*The VP1 N-Terminal Sequence of Canine Parvovirus Affects Nuclear Transport of Capsids and Efficient Cell Infection*». Journal of Virology. Vol. 76, no. 4, p. 1884-1891.
- WEICHERT, W.S., J.S. Parker, A.T. Wahid, S.F. Chang, E. Meier, C.R. Parrish, 1998. «*Assaying for Structural Variation in the Parvovirus Capsid and its Role in Infection*». Virology. Vol. 250, no. 1, p. 106-117.
- WINTER, J., 1996. «*Bacteriophage Display Libraries*». Protein Engineering, Principles and Practice. Wiley-Liss, New-York, p. 349-367.
- WU, H., M.G. Rossmann, 1993. «*The Canine Parvovirus Empty Capsid Structure*». Journal of Molecular Biology. Vol. 233, p. 231-244.
- XIE, Q., M.S. Chapman, 1996. «*Canine Parvovirus Capsid Structure Analysed at 2.9Å Resolution*». Journal of Molecular Biology. Vol. 264, no. 3, p. 497-520.
- YU, L., R.A. Deems, J. Hajdu, E.A. Dennis, 1990. «*The Interaction of Phospholipase A<sub>2</sub> with Phospholipid Analogues and Inhibitors*». The Journal of Biological Chemistry. Vol. 265, no. 5, p. 2657-2664.
- ZÁDORI, Z., J. Szelei, M.-C. Lacoste, Y. Li, S. Gariépy, P. Raymond, M. Allaire, I.R. Nabi, P. Tijssen, 2001. «*A Viral Phospholipase A<sub>2</sub> is Required for Parvovirus Infectivity*». Developmental Cell. Vol. 1, no. 2, p. 291-302.