

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

« *Morphogenèse de la capside du parvovirus porcin* »

Par
Rayan Lemaire

Mémoire
Présenté pour l'obtention du grade de
De Maître ès Sciences (M.Sc.) en virologie & immunologie

Directeur de recherche : Pr. Peter Tijssen, INRS-IAF

Mai 2010

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Pr. Peter Tijssen, de m'avoir permis de faire ce travail de recherche dans son laboratoire, ainsi que pour sa patience, sa générosité et sa compréhension. Je lui souhaite de tout cœur une guérison rapide et totale.

Je remercie aussi mes collègues de laboratoire et particulièrement Sandra Fernandes, de m'avoir appris différentes techniques requises pour ce projet.

Je remercie énormément ma famille que j'aime tant, qui m'a soutenu tout au long de ce projet et sans qui je n'aurais pas pu achever ce travail. Leur soutien m'a été nécessaire.

Je remercie mes amis québécois qui m'ont aidé à m'adapter à la ville de Montréal, et à connaître les petites astuces qui rendent la vie plus agréable.

RÉSUMÉ

Le Parvovirus Porcin (PPV) est une des causes majeures des problèmes de reproduction chez le porc. Ce virus est aussi capable d'augmenter les effets pathologiques d'autres virus porcins. De plus, l'utilisation croissante de greffes d'organes ou de cellules d'origines porcines pourrait augmenter le risque de passage de la barrière inter-espèces.

Le PPV est un virus non enveloppé, à symétrie icosaédrique, contenant un ADN simple brin d'environ 5kb. Sa capside est formée par l'assemblage de 3 protéines VP1, VP2 et VP3, qui ne diffèrent que par leur partie N-terminale.

Comprendre comment la capside se forme pourrait permettre la mise au point d'antiviraux efficaces, ciblant les différentes étapes de la morphogenèse de cette capside.

Un modèle hypothétique d'assemblage a été décrit chez d'autres parvovirus, avec une formation cytoplasmique de trimères, transportés au noyau pour s'assembler en capside. Ce modèle permet de supposer que les liaisons intra-trimères et inter-trimères font intervenir des éléments structuraux spécifiques et conservés au cours de l'évolution.

Nous avons donc analysé la morphologie de la liaison intra et inter-trimères. Nous avons découvert que la liaison intra-trimères faisait intervenir la partie C-terminale des VP de manière caractéristique, et, qu'à la surface entre les trimères, existait des poches conservées au cours de l'évolution. Une de ces poches permet de piéger le tryptophane 540 des VP, rendant la liaison spécifique et confirmant le model d'assemblage tardif (nucléaire) entre les trimères. Les premiers essais de production et la purification à petite échelle du mutant W540-A de VP2 en système baculovirus, ont été effectués avec succès. Le but était d'avoir suffisamment de complexes trimériques pour des études ultérieures. Cependant, le degré de pureté et la quantité produite restent assez faibles.

Nous avons de plus muté la partie C-terminale des VP dans le clone infectieux en ajoutant une tyrosine après le dernier acide aminé, ou en supprimant une leucine avant ce dernier. Après transfection en cellules porcines, la visualisation du phénotype par immunofluorescence et microscopie confocale a montré une localisation cytoplasmique des protéines de structure, confirmant l'importance de la partie C-terminale dans la formation précoce des trimères.

Rayan Lemaire



Dr. Peter Tijssen, Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

<u>Liste des Figures et de Tableaux</u>	1
<u>Liste des Abréviations</u>	2
INTRODUCTION	3
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES	6
<u>I. Description et caractéristiques générales du virus</u>	7
1.1. Composition et caractéristiques physiques	7
1.2. Détection et quantification du PPV.....	7
1.3. Les protéines composant la structure virale	8
<u>II. Classification des parvovirus</u>	11
<u>III. Pathogénicité et classification des souches de PPV</u>	15
<u>IV. Analyse génétique, antigenicité et vaccins chez le PPV</u>	17
<u>V. Premières étapes de l'infection parvovirale</u>	20
V.1. De la surface cellulaire au système endosomal	20
V.2. La livraison du génome viral au noyau	23
<u>VI. Etapes de la réplication parvovirale</u>	24
VI.1. Nécessité de la phase S cellulaire	24
VI.2. Transcription épissage et produits protéiques	24
VI.3. Modèle de réplication du génome parvoviral.....	28
VI.4. Protéines non structurales : fonctions potentielles dans le cycle viral	31
<u>VII. Facteurs influençant la permissivité cellulaire au PPV</u>	35
<u>VIII. Structure de la capside du PPV</u>	36
VIII.1. Généralités	36
VIII.2. Caractéristiques morphologiques	36
VIII.3. Stabilité et variabilité des acides aminés	40
<u>IX. Assemblage de la capside</u>	43
IX.1. Intermédiaires d'assemblage	43
IX.2. Localisation cellulaire et structure des intermédiaires d'assemblage	44
IX.3. Modèle hypothétique d'assemblage	44
<u>X. Etude structurale des virus</u>	47

MÉTHODOLOGIE.....	49
<u>I. Les types cellulaires et bactériens.....</u>	50
1.1. La culture routinière des cellules.....	50
1.2. Les bactéries électrocompétentes.....	51
<u>II. Les vecteurs et la séparation des fragments d'ADN</u>	51
II.1 Les plasmides utilisés.....	51
II.2 La séparation de fragments d'ADN sur gel d'agarose.....	51
<u>III. Clonage des mutants en C-terminal dans le vecteur intermédiaire</u>	52
III.1. Préparation des mutants.....	52
III.2. Digestion du vecteur intermédiaire et des inserts	56
III.3. Ligation des inserts dans le vecteur intermédiaire.....	57
III.4. Transformation dans les bactéries électrocompétentes	57
III.5. Extraction d'ADN par minipréparation et vérification des bons clones.....	57
III.6. Extraction d'ADN par midipréparation et phénol/chloroforme	58
III.7. Purification d'ADN par la trousse Miniprep Express Matrix pour le séquençage.....	59
<u>IV. Clonage des mutants dans le clone infectieux, transfection et détection de VP2. ..</u>	60
IV.1. Digestion du clone infectieux et du clone intermédiaire	60
IV.2. Ligation de l'insert dans le clone infectieux et sélection des clones	60
IV.3. Extraction et purification d'ADN avec la trousse d'extraction de Qiagen	62
IV.4. Transfection des cellules PT à la lipofectamine	62
IV.5. Détection des protéines VP2 par immunofluorescence	63
<u>V. Production du mutant W540A de VP2 en système baculovirus.....</u>	64
V.1. Clonage du mutant W540 dans le vecteur pFastBacHTB.....	64
V.2. Transformation dans les bactéries DH10Bac contenant le bacmide.....	64
V.3. Extraction des bacmides et sélection des recombinants par PCR.....	67
V.4. Obtention de baculovirus recombinants	68
V.4.1. Transfection du bacmide dans les cellules Sf9.....	68
V.4.2. Première amplification du stock de baculovirus.....	68
V.4.3. Deuxième amplification du stock de baculovirus	68
V.5. Test des culots de cellules infectées par le baculovirus recombinant.....	69
V.5.1. Electrophorèse sur gel SDS-PAGE.....	69

V.5.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose	70
V.5.3. Révélation de la membrane de nitrocellulose	70
V.6. Titration de baculovirus recombinant.....	70
V.7. Purification de protéines recombinantes	71
<u>VI. Analyse informatique de la capside du parvovirus porcin</u>	73
VI.1. Généralités	73
VI.1.1. La base de données VIPERdb.....	73
VI.1.2. Le logiciel de modélisation moléculaire PyMOL	74
VI.1.3. La base de données CASTp.....	74
VI.2. Analyse et visualisation du contact entre les trimères.....	75
VI.2.1. Génération d'oligomères et création de modèles	75
VI.2.2. Sélection et coloration des acides aminés	78
VI.2.3. Séparation des deux trimères et visualisation du contact	79
VI.3. Analyse des contacts intra-trimères.....	80
VI.4. Structure secondaire en « cartoons » des programmes de visualisation moléculaire	80
RÉSULTATS	82
<u>I. Utilisation du couple PyMOL, base de données VIPER.</u>	83
<u>II. Visualisation et analyse du contact inter-trimères au niveau de l'axe de symétrie2</u>	85
II.1 Vérification de la présence de poches à l'aide du programme CASTp	86
II.2 Conservation du mode de liaison au cours de l'évolution.....	93
<u>III. Expression et purification de VP2 mutée (W540-A), dans les cellules Sf9</u>	98
<u>IV. Visualisation et analyse du contact intra-trimères</u>	103
<u>V. Expression des mutants Leu(-) et Tyr(+) en C-terminale dans les cellules PT</u>	107
V.1. Obtention des mutants.....	107
V.2. Transfection et révélation des mutants dans les cellules PT	107
DISCUSSION	110
<u>I. Points importants de la liaison entre les trimères</u>	111
<u>II. Production de VP2 mutée (W540A) en cellules d'insectes</u>	113

<u>III. Mutations dans la partie C-terminale de VP2</u>	115
CONCLUSION	117
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	120

Liste des Figures et des Tableaux :

Figures :

Figure 1 : Constitution générale du parvovirus porcin	9
Figure 2 : Classification des Parvoviridae et des souches de PPV	12
Figure 3 : Premières étapes de l'infection	21
Figure 4 : Transcription, épissage et produits protéiques	25
Figure 5 : Réplication du génome parvoviral	29
Figure 6 : Cycle global de réplication parvovirale	33
Figure 7 : Structure de la capside parvovirale	37
Figure 8 : Stabilité de la capside.....	41
Figure 9 : Modèle hypothétique d'assemblage de la capside	45
Figure10 : Formation des mutants Leucine- et Tyrosine+ dans le clone infectieux...	53
Figure 11 : Expression du mutant W540A de VP2 dans les cellules Sf9.....	65
Figure 12 : Acides aminés du contact entre les trimères	76
Figure 13 : Présence de poches à la surface de VP2 à l'interface des trimères.....	87
Figure 14 : Contacts entre les poches et les acides aminés conservés entre les trimères	90
Figure 15 : Conservation du mécanisme de liaison au cours de l'évolution	95
Figure 16 : Production et purification du mutant W549-A protéines recombinantes en cellules Sf9.....	100
Figure 17 : Visualisation du contact entre les sous-unités formant un trimère	104
Figure 18 : Phénotype des cellules PT transfectées avec les mutants Leu- et Tyr+. 109	
Figure 19 : Conservation du mécanisme de liaison au cours de l'évolution	114

Tableaux :

Tableau 1 : Séquences des amorces sens et anti-sens ayant servi à la mutation par PCR de la partie C-terminale de VP2	55
Tableau 2 : Séquences des amorces qui ont servi au séquençage de VP1 et VP2 après le clonage dans le clone infectieux.....	61

Liste des Abréviations :

Å : Ångström

AAV : adeno-associated virus

AMDV : aleutian mink disease virus

B19 : parvovirus humain

CASTp : Computed Atlas of Surface Topography of Proteins

CPV : parvovirus canin

FPV : virus de la panleucopénie féline

MVC : petit virus de canins

MVM : petit virus de murins

NLM : motif de localisation nucléaire

NLS : signal de localisation nucléaire

PLA2 : phospholipase A2

PPV : parvovirus porcin

SEN : signal putatif d'export nucléaire

ST : testicule de porc

VIPERdb : base de données. abr. ``Virus Particle Explorer Database``

VLP : particule ressemblante de virus (capsides exprimées)

VP : protéines virales de structure

VP1-Up : Partie unique N-terminale de VP1

INTRODUCTION

Le Parvovirus Porcin (PPV) est une des causes majeures des problèmes de reproduction chez le porc. En effet, ce virus est entre autre, responsable de la mort fœtale et embryonnaire, de l'apparition de porcelets mort-nés, ainsi que de l'avortement des truies. Récemment, il a aussi été démontré que le PPV était capable d'aggraver les effets pathologiques engendrés par d'autres types de virus porcins. En raison des pertes animales et des coûts de vaccination non négligeables, le PPV est reconnu comme responsable de pertes économiques considérables chez les éleveurs et ceci dans le monde entier.

Le risque d'adaptation du PPV à l'homme est considéré comme faible, mais l'utilisation d'organes et de tissus porcins pour des greffes chez l'humain, est en constante croissance. De plus, ce type de greffe accroît la possibilité de contact entre le PPV et l'homme, et donc le risque de passage inter-espèces. Ce risque est conforté par la récente découverte de phénomènes de recombinaison entre différentes souches de PPV (pouvant conduire à de nouveaux variants), la probabilité de recombinaison lors de greffes est d'autant plus important que 30 à 60% des adultes seraient déjà séropositifs pour un parvovirus humain (B19 : cause des avortements...). De plus l'adaptation durant les années 70 du parvovirus félin (proche du PPV) au chien, par la mutation de quelques acides aminés de la capsid montre à quel point le passage inter-espèces peut être facile et rapide.

Le PPV est un virus à ADN simple brin négatif, non enveloppé, à capsid icosaédrique. Cette dernière est constituée par l'assemblage de deux protéines : VP1 et VP2, qui diffèrent uniquement par leur partie N-terminale. La protéine VP2 est capable à elle seule de produire la capsid virale, comme ce fut largement démontré lors de production de capsides (VLPs) en cellules d'insectes et même végétales. Chez le PPV, la capsid a un rôle important non seulement parce qu'elle protège le génome mais aussi car elle intervient dans l'infection et dans le tropisme du virus. Ainsi, la différence de tropisme entre deux souches de PPV, que sont NADL2 et Kresse, n'est due qu'à quelques acides aminés situés dans la capsid.

Comprendre la morphogenèse de la capsid, c'est-à-dire les étapes permettant d'aboutir à la formation de cette dernière, est un travail qui à long terme pourrait permettre la production d'antiviraux qui cibleraient des étapes précoces de l'assemblage. Certaines équipes de recherche, travaillant sur d'autres parvovirus, ont émis un modèle hypothétique d'assemblage qui passerait par la production dans le cytoplasme d'intermédiaires

d'assemblage trimérique, qui seraient eux-mêmes transportés au noyau pour s'assembler en capsid.

Afin de conforter ce modèle hypothétique, nous avons émis l'hypothèse que si ce modèle est vrai, cela signifierait que les liaisons intra et inter-trimères devraient faire intervenir des éléments structuraux importants et conservés nécessaires à la morphogenèse de la capsid des parvovirus

C'est dans cette optique, que la première partie de notre travail, a consisté en l'analyse de l'interface inter et intra-trimères, et ceci en utilisant comme outils : la structure cristallographique du PPV et d'autres parvovirus, les tables de contact de la base de données VIPERdb, le programme de modélisation moléculaire PyMOL, ainsi que la base de données CASTp. Cette partie a permis de montrer que l'acide aminé conservé W540, intervenait de manière caractéristique, en se liant à une poche dans la liaison inter-trimères et que (sauf les boucles 3 et 4) la partie C-terminale était impliquée de manière importante dans la liaison intra-trimères.

Dans cette étude, le mutant de VP2 540-A a été produit dans les cellules d'insectes Sf9, avec l'idée d'analyser ultérieurement le complexe formé (supposément des trimères) ou de produire des anticorps permettant de suivre la morphogenèse de la capsid.

La partie C-terminale des VP a, quant à elle, fait l'objet d'un allongement et d'un raccourcissement, grâce à la mise au point d'une stratégie de mutagenèse et de clonage, qui permet d'ajouter une tyrosine après, ou de retirer une leucine avant le dernier acide aminé dans le clone infectieux. Les mutants ont par la suite servi à la transfection de cellules porcines, puis, une analyse par immunofluorescence (IF) et microscopie confocale à l'aide d'anticorps anti-VP2 a été réalisée.

Notre étude, que ce soit du point de vue théorique ou pratique, non seulement confirme le modèles d'assemblage de la capsid des parvovirus, mais aussi elle met en lumière différents éléments structuraux impliqués et parfois conservés au cours de l'évolution des parvovirus, cette étude apporte aussi une vision sur les interactions protéines-protéines existant au sein de ces virus et qui pourraient se retrouver dans d'autre virus à symétrie icosaédrique comme ceux retrouvés dans la base de données VIPER ou même dans des virus à symétrie non icosaédrique.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Description et caractéristiques générales du virus

I.1. Composition et caractéristiques physiques

Le PPV peut être isolé à partir de nombreux tissus ou échantillons pathologiques porcins tels que les leucocytes, les poumons, les semences germinales, les dermatites ou les excréments provenant de porcs diarrhéiques (Bergeron et al., 1993). Le virus est visible en microscopie électronique où il se présente sous la forme d'une particule virale non enveloppée, d'environ 25 nm de diamètre, et de structure icosaédriques. Sa capsid est composée de 60 copies d'un mélange de protéines structurales VP1, VP2 et VP3 (Molitor et al., 1983) et contient un génome d'ADN linéaire de sens négatif d'environ 5 kb, qui comporte des séquences palindromiques à ses deux extrémités et des mésappariements ou « bubbles ». Ces séquences interviennent lors de la réplication du virus (Bergeron et al., 1993; Tijssen et al., 1995) (*figure 1 A ,B*).

Le virion du PPV est extrêmement résistant aux conditions environnementales et à l'inactivation. Il est stable entre des pH variant de 3 à 9 et peut supporter des températures de 56°C durant environ 60 minutes. Il est aussi capable de résister à de nombreuses enzymes (DNases, RNases, Pepsine et Trypsine), de même qu'à de nombreux biocides. Il est cependant possible d'inactiver le virus par UV, formaline, b-propiolactone, ainsi que des agents oxydants (Eterpi et al., 2009; Berns et al., 1994; Arella et al., 1990).

Le PPV peut être purifié, par exemple à partir d'homogénats fœtaux porcins infectés, par précipitation au CaCl₂, suivie d'une centrifugation sur un gradient de chlorure de césium. On obtient ainsi une bande d'une densité d'environ 1,4 g/ml, correspondant aux virions pleins (Molitor et al., 1983).

I.2. Détection et quantification du PPV

La réplication du PPV, comme celle d'autres parvovirus, induit des effets cytopathiques dans les cellules hôtes. Cette caractéristique est notamment utilisée pour déterminer le TCID₅₀ (Heldt et al., 2006).

Une méthode sensible pour la quantification des virus infectieux est le test de fluorescence : cette méthode requiert l'utilisation d'anticorps spécifiques et la microscopie à immunofluorescence. Une autre méthode est le titre d'hémagglutination : celle-ci est fréquemment utilisée pour déterminer la quantité relative de PPV car ce virus a la

caractéristique d'agglutiner les érythrocytes de différentes espèces animales (Mengeling, 1972).

Le test d'inhibition d'hémagglutination (HIA) est une méthode qui est aussi utilisée depuis longtemps. Elle est basée sur la capacité des anticorps anti-PPV à bloquer la liaison du virus aux globules rouges, permettant ainsi la détection d'anticorps spécifiques anti-PPV (Hogg et al., 1977).

La PCR est quant à elle utilisée pour la détection de l'ADN viral (Molitor et al., 1991) et récemment des chercheurs se sont intéressés à la PCR en temps réel, comme outil de détection et de quantification (Wilhelm et al., 2006; McKillen et al., 2007; Miao et al., 2009).

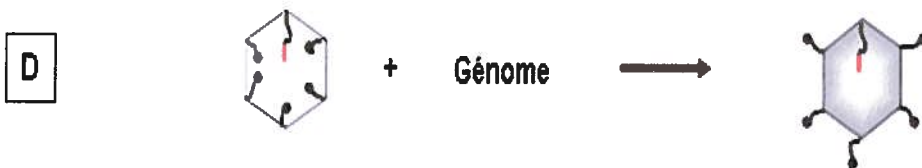
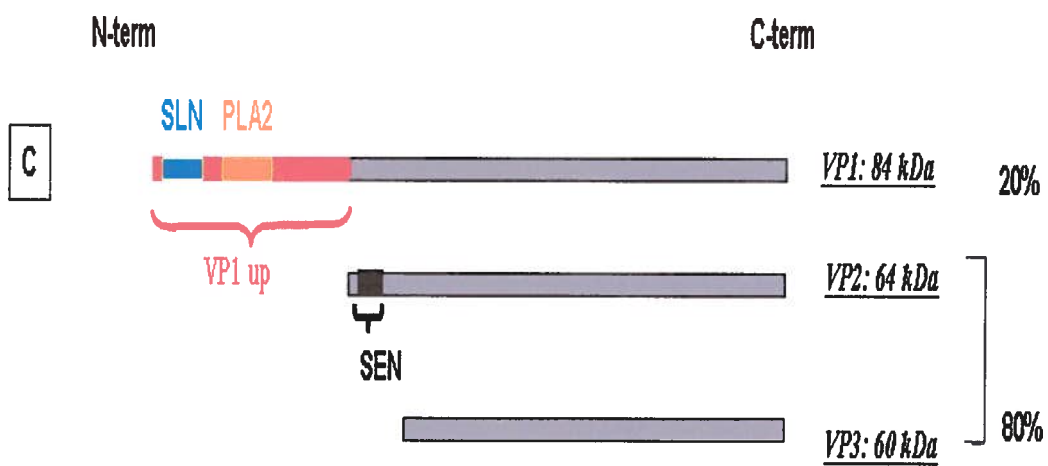
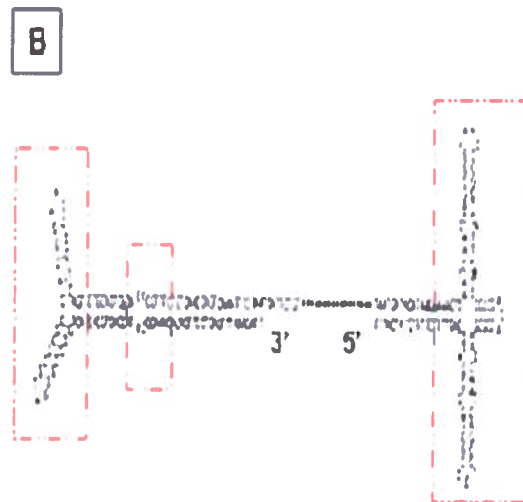
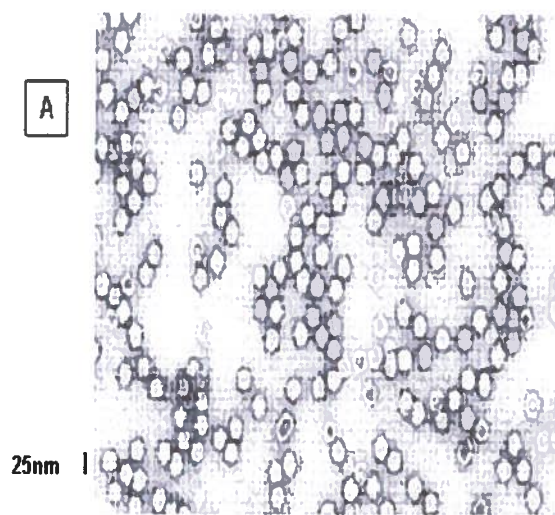
I.3. Les protéines composant la structure virale

Les protéines VP1, VP2 et VP3, composant la structure virale, possèdent les poids moléculaires respectifs de 83 kDA, 64 kDA et 60 kDA (Molitor et al., 1983). Ces trois protéines diffèrent uniquement par leur partie N-terminale. Ainsi, la protéine VP1 qui compose environ 20% de la capside virale, possède dans son extrémité N-terminale une séquence de 150 acides aminés qui lui est spécifique (VP1-Up) (*figure 1 C*). Cette séquence contient un motif phospholipase A2 (PLA2) (dont la mutation réduit l'activité phospholipase-calcium dépendante et l'infectivité virale) et un signal de localisation nucléaire. VP1-Up réside à l'intérieur du virion et peut être externalisée durant l'infection (Zadori et al., 2001; Canaan et al., 2004).

La protéine VP2 et la protéine VP3 composent à elles deux, environs 80% de la capside. La protéine VP2 comporte dans sa partie N-terminale, une région riche en glycine et comporterait potentiellement un signal d'export nucléaire (Maroto et al., 2004). De plus, lorsque le virion est plein, la partie N-terminale de la protéine est externalisée (*figure 1 D*) ce qui permet le clivage partiel de celle-ci, conduisant à la production de la protéine VP3. Le clivage protéolytiques de VP2 en VP3 est réalisé dans l'environnement extracellulaire suite à la relâche du virion, ou sinon, ce clivage est réalisé dans l'endosome durant l'entrée cellulaire dans une nouvelle cellule hôte (Farr et al., 2006). La protéine VP2 a la capacité, à elle seule, de former la capside virale ou VLP y compris lorsque celle-ci est produite dans des cellules végétales (Rymerson et al., 2003).

Figure 1 : Constitution générale du parvovirus porcin

- (A)** Vue en microscopie électronique du PPV
Virus non enveloppé de 25nm de diamètre et de capside icosaédrique très résistante à différents traitements chimiques ainsi qu'aux conditions environnementales.
- (B)** Structure du génome
Le génome du PPV est constitué d'un ADN simple brin de sens négatif d'environ 5 kb avec, à ses deux extrémités, des séquences palindromiques permettant un repliement en forme de Y à l'extrémité 3', et en forme de croix à l'extrémité 5'. Ce génome comporte aussi des mésappariements ou « bubbles ».
- (C)** Protéines composant la structure du virus.
La structure du virus est composée de trois protéines : VP1, VP2 et VP3. La première, constituant environ 20% de la capside, et l'ensemble des deux autres environ 80%. Ces trois protéines partagent une même extrémité C terminale.
La partie N-terminale unique de VP1 (VP1-Up), comporte un signal de localisation nucléaire SLN ainsi qu'une phospholipase A2 (PLA2), tandis que la partie N terminale de VP2 comporterait un signal d'export nucléaire SEN. VP3, quant à elle, provient du clivage protéolytique de la partie N-terminale de VP2.
- (D)** Les parties N-terminales de VP1 et VP2 se trouvent à l'intérieur de la capside vide, alors que dans la capside contenant le génome viral, les parties N-terminales de VP2 sont externalisées.



II. Classification des parvovirus

Les parvovirus sont de petits virus non enveloppés, avec un génome d'ADN simple brin de près de 5kb, codant pour des protéines non structurales et des protéines de capsides. En se basant sur leur spectre d'hôte, la famille Parvoviridae a été classée en deux sous familles : les Parvovirinae, qui infectent les vertébrés, et les Densovirinae, qui infectent les insectes et les arthropodes (van Regenmortel et al., 2000; Tattersall et al., 2005). La sous-famille des Parvovirinae comporte plusieurs genres (*figure 2 A, B*).

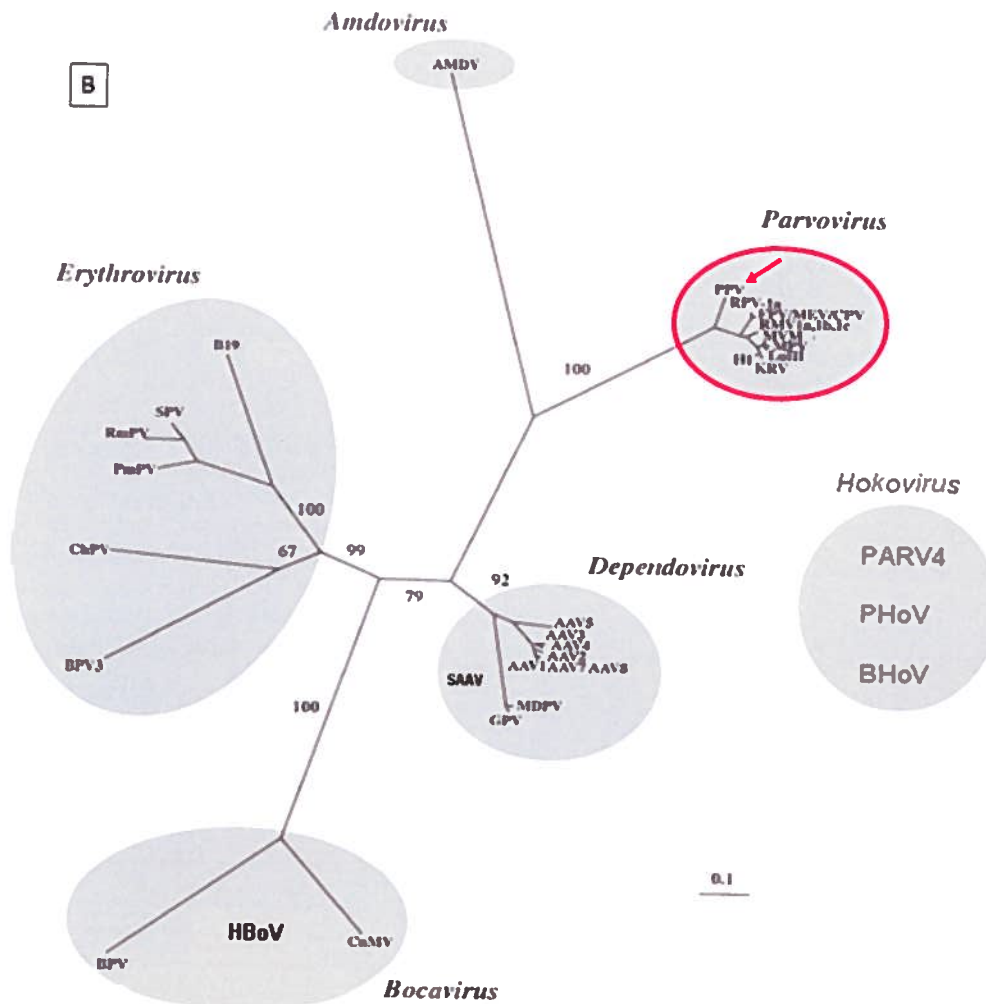
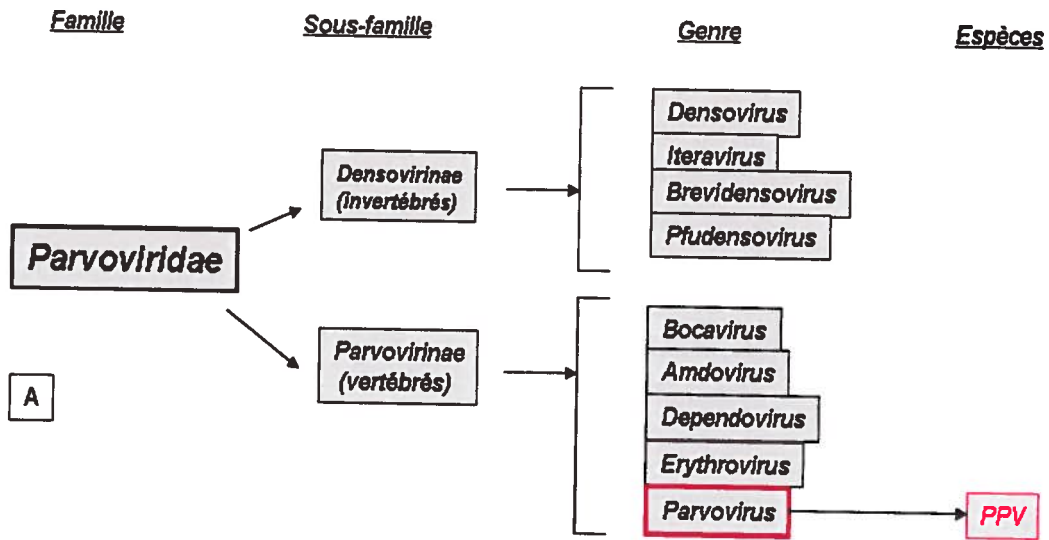
Le genre Bocavirus qui comporte notamment le bocavirus humain (HBoV) qui a été récemment découvert en 2005 dans des échantillons de tractus respiratoires et qui a été associé à des maladies respiratoires et des gastroentérites chez les enfants (Allander et al., 2005 ; Lau et al. 2007). Ce virus est très proche des virus MVC (petit virus de canins) et du BPV (parvovirus bovin). Ces deux virus sont associés à des symptômes respiratoires et entériques chez les jeunes animaux (Allander et al., 2005; Durham et al., 1985). Le nom bocavirus provient du mélange des adjectifs bovin et canin.

Le genre Erythrovirus contient notamment les virus PmPV (Pig-tailed Macaque Parvovirus), le RmPV (Rhesus macaque parvovirus), le SPV (Simian parvovirus) et surtout le B19, qui jusqu'à la découverte du bocavirus humain (HBoV) en 2005, était le seul parvovirus à infecter et à causer des maladies chez l'humain (Lindner et Modrow, 2008; Kauffmann et al., 2004).

Un nouveau genre de parvovirus a été proposé, il s'agit du genre Hokovirus. En effet, le virus PARV4 qui est un virus récemment identifié dans un pool de plasma destiné à l'industrie de dérivés sanguins (Fryer et al., 2006) et dans des échantillons de plasma individuels (Fryer al., 2007), est distinct des autres genres de parvovirus. La découverte de deux nouveaux parvovirus : PHoV (porcine hokovirus) et BHoV (bovine hokovirus), provenant d'échantillons porcins et bovins de Hong Kong et qui sont phylogénétiquement liés au virus PARV4, a permis de proposer le nouveau genre Hokovirus, qui comprendrait ces trois virus (Lau et al., 2008).

Figure 2 : Classification des Parvoviridae et des souches de PPV

- (A)** La famille des Parvoviridae est composée de deux sous-familles, celle des Densovirinae, comportant les parvovirus des invertébrés et celle des Parvovirinae, comportant les parvovirus des vertébrés. Le parvovirus porcine appartient au genre Parvovirus, qui lui-même appartient à la sous-famille des Parvovirinae.
- (B)** Représente la distance phylogénétique entre les différents genres de la sous-famille des Parvovirinae, de même que des exemples d'espèces composant ces genres. Ainsi, on peut voir que le parvovirus porcine est très proche des parvovirus murins (MVM), canins (CPV), ou encore félin (FPV). Il a récemment été proposé de rajouter un nouveau genre : le genre Hokovirus, qui serait composé de trois membres dont le virus PARV4, identifié dans du plasma sanguin humain.
- (C)** La classification des souches de PPV se fait à l'aide du profil pathologique (pathotype) caractéristique de chacune d'entre elles, ainsi, il existerait actuellement 5 pathotypes permettant de classer toutes les souches de PPV.



C

<u>Espèces</u>	<u>Groupes</u>	<u>Souches exemples</u>	<u>Pathotypes</u>
PPV	1	NADL-2	Non pathogène Cause une virémie limitée Ne traverse pas la barrière placentaire Lors d'infections expérimentales Utilisée comme souche vaccinale
	2	NADL-8	Cause une virémie Traverse la barrière placentaire Fatale aux fœtus non-immunocompétents
	3	Kresse IAF-A54	Associé à des dermatites Fatale aux fœtus immunocompétents
	4	IAF-A83	Associé à des problèmes entériques
	5	À déterminer	Associé au SDPS (PMWS) Syndrome de Dépérissement Post Sevrage Et au SRCP (PRDC) Syndrome Respiratoire Complexe du Porc

Le genre Dependovirus regroupe notamment les virus AAV (Adeno-associated virus), qui sont actuellement parmi les vecteurs viraux les plus utilisés pour la thérapie génique. En effet, ces virus ne sont pas pathogènes, sont persistants, et un grand nombre de sérotypes est disponible. L'infection productive de ces virus n'intervient qu'en présence de virus auxiliaires, que ce soit Adenovirus ou Herpesvirus. En l'absence de virus auxiliaires, l'AAV (sérotipe 2) peut se mettre en latence en s'intégrant dans le chromosome 19q13.4, faisant de lui le seul virus à ADN de mammifère connu à ce jour capable d'une intégration site-spécifique (Daya et Berns, 2008). D'autres parovirus ont été classés dans ce genre, notamment un parovirus isolé du python royale découvert en 2004 : le SAAV (serpentine adeno-associated virus) (Farkas et al., 2004).

Le genre Parvovirus comprend un ensemble de virus que l'on peut retrouver chez des espèces d'animaux très différentes tels que le porc (PPV : porcine parvovirus), la souris (MVM et MPV), le chien (CPV : parvovirus canin), les félins (FPV), le hamster (H1), et le rat (KRV).

Enfin le genre Amdovirus comporte quant à lui une unique espèce qui est le AMDV (« Aleutian mink disease virus ») chez le vison.

III. Pathogénicité et classification des souches de PPV

Le parvovirus porcin (PPV) a pour la première fois été isolé à partir de truies en Allemagne (Mayr et al, 1968), puis par la suite a été retrouvé dans différentes régions du monde, où il cause des problèmes économiques chez les éleveurs de porcs (Jenkins, 1992). En effet, le PPV est une des causes majeures dans les problèmes de reproduction chez le porc (Joo et al., 1976; Mengeling et Cutlip, 1975, 1976; Redman et al., 1974), ainsi, lorsque des truies non immunisées sont infectées avec du PPV durant la gestation, le virus traverse habituellement le placenta et infecte la portée. Des études expérimentales indiquent que les conséquences cliniques d'une infection trans-placentaire sont dépendantes du stade de gestation durant lequel le futur porcelet est exposé au virus (Redman et al., 1974; Choi et al., 1987; Joo et al., 1976; Mengeling, 1978; Mengeling et Paul., 1981). Ainsi, une infection se produisant avant l'âge de 70 jours de gestation,

provoque la mort et la résorption des embryons ou bien la momification in utero des fœtus, tandis qu'une infection après l'âge de 70 jours de gestation, n'empêche pas la survie et l'arrivée à terme de la portée avec un sérum contenant un haut niveau d'anticorps. (Larger et al., 1992). Il faut cependant noter que ce dogme possède des exceptions, en effet, certaines souches de PPV sont capables de tuer des fœtus infectés relativement tard dans la gestation (après 70 jours de gestation), et donc même si l'immunocompétence a été acquise (Choi et al., 1987).

De plus, bien que l'infection des porcs par la voie oronasale ne donne pas de signes cliniques significatifs, le PPV est malgré tout lié à des lésions de la peau apparaissant chez les cochonnets (Kresse et al., 1985), des néphrites interstitielles chez de vieux porcs destinés à l'abattage (Drolet et al., 2002), et des myocardites non suppuratives chez des cochonnets produisant du lait (Bolt et al., 1997).

D'autre part, le PPV pourrait agir en synergie avec d'autres virus ou bactéries pour induire des pathologies. Ainsi, lors d'une co-infection avec le circovirus porcin 2 (PCV2), le PPV serait responsable d'un certain nombre de cas significatifs de PMWS (postweaning multisystemic wasting syndrome ou syndrome de dépérissement post sevrage : SDPS) (Kim et al., 2003; Kim et Chae, 2004; Opriessnig et al., 2004) et de signes cliniques sévères, alors que l'inoculation avec (PCV2) seul ne provoquerait que des lésions histologiques modérées (Nawagitgul et al., 2002).

En tenant compte des observations précédemment décrites, le virus peut être classifié en cinq pathotypes (biotypes) cliniques se référant à la pathogénicité (Qi et Cui, 2009) (*figure 2 C*).

Le premier groupe comporte la souche non pathogénique NADL-2, qui est actuellement utilisée comme vaccin atténué. Cette souche cause une virémie limitée, et dans des infections expérimentales, ne traverse pas la barrière placentaire (Paul et Mengeling, 1980). Les vaccins sont administrés lors de la puberté de façon à garantir une protection lors de la gestation, en produisant un certain titre d'anticorps dans le sang de la future mère, qui va permettre d'entraver la transmission trans-placentaire lors d'un contact

ultérieur avec le virus sauvage. Une autre souche est aussi classée comme non pathogène, il s'agit de la souche KBSH (Molitor et al., 1985).

Le second groupe contient la souche NADL-8 et d'autres souches virulentes (IAF-76) isolées à partir de fœtus momifiés et de fœtus morts. Ces souches causent une virémie, traversent la barrière placentaire et infectent fatalement les fœtus (Mengeling et Cutlip, 1975).

Le troisième groupe est composé de souches de PPV virulentes comme Kresse et IA-A54. Ces souches sont associées à des dermatites (Kresse et al., 1985), et contrairement aux autres souches virulentes, elles peuvent tuer les fœtus même immunocompétents (Choi et al., 1987).

Le quatrième groupe de PPV contient les souches entériques tels que IAF-83 (Bergeron et al., 1996).

Un cinquième groupe comporte des souches de PPV qui ont été associées au syndrome de dépérissement post sevrage (SDPS) et au syndrome respiratoire complexe du porc (SRCP). Le type de souches responsables de ces désordres reste à déterminer (Qi et Cui, 2009).

IV. Analyse génétique, antigenicité et vaccins chez le PPV

Les infections aux parvovirus sont majoritairement contrôlées par la réponse immunitaire humorale (Paul et al., 1980), même s'il a été démontré qu'il pouvait exister une activité cytotoxique des lymphocytes T chez des porcs expérimentalement infectés par le PPV, et qu'une réponse cellulaire interviendrait donc en complément à la réponse humorale dans le contrôle de l'infection parvovirale (Ladekjaer-Mikkelsen et Nielsen, 2002). Les porcs infectés par le PPV développent des anticorps contre les protéines structurales mais aussi contre les protéines non structurales alors que les porcs vaccinés avec le virus inactivé développent des anticorps uniquement contre les protéines structurales du PPV (Madsen et al., 1997).

L'identité antigénique chez le PPV peut être établie en utilisant des tests sérologiques tels que la neutralisation de virus et l'inhibition d'héماغglutination, et il est admis qu'il n'existe qu'un seul sérotype chez le PPV (Mengeling, 2006).

Récemment dans le but d'étudier la variabilité génétique chez le PPV, les séquences complètes des protéines de capsides (VP1/VP2) provenant de 8 isolats Allemands (dont une souche vaccinale), 1 isolat anglais, 22 brésiliens, 3 asiatiques, 2 américaines ont été analysées et comparées. Cette analyse a permis de montrer que la variabilité chez le PPV était plus importante que ce qui était présumé, qu'il existait deux génotypes bien distincts et surtout que certains isolats allemands diffèrent génétiquement de la souche vaccinale (Zimmermann et al., 2006). Il faut souligner que bien que les souches de PPV puissent être divisées en deux groupes phylogénétiques différents, il ne semble pas exister de relation entre cette classification et la pathogénicité (Shangjin et al., 2009). Cependant, la différence génétique semble accompagnée d'une différence antigénique importante: en effet, la souche allemande (PPV-27a) a montré un titre 100 à 1000 fois inférieur lors de tests de neutralisation de sérum, suggérant la possibilité d'un nouveau variant antigénique. Les auteurs lui ont donc attribué un possible mécanisme encore inconnu d'échappement au système immunitaire (Zeeuw et al., 2007).

L'analyse génétique de différentes souches de PPV a en plus permis de montrer qu'il existait un phénomène de recombinaison entre souches. Ce phénomène est aussi retrouvé chez d'autres parvovirus. La pression du système immunitaire pourrait donc avoir joué un rôle important dans l'émergence de souches recombinantes et la création de nouveaux variants antigéniques (Shackelton et al., 2007; Zeeuw et al., 2007).

Ces récentes découvertes ont amené certains chercheurs à se demander si la vaccination contre le PPV, qui se fait avec des isolats de PPV de génotype 1, pouvait protéger les animaux contre des virus de génotype 2 (comme la souche allemande hautement pathogène PPV-27a). Une récente étude a ainsi permis de montrer que la vaccination contre le PPV permet la protection contre les maladies, mais n'empêche pas l'infection et la propagation virale après infection avec une souche hétérologue de virus (Jozwik et al., 2009).

Les vaccins actuellement disponibles sont produits par culture du virus natif dans des cellules primaires d'origines porcines ou dans des lignées cellulaires établies, puis, les virus infectieux sont isolés et inactivés à l'aide d'agents chimiques (Antonis et al., 2006). Ces procédés sont coûteux, laborieux, et présentent un risque dû à la nécessité de faire croître et de contrôler une large quantité de virus infectieux. De plus, ces vaccins nécessitent un grand nombre d'animaux pour les cellules primaires. Les limitations pratiques dues à une faible réplication in vitro du PPV, additionnées aux problèmes relatifs à la sécurité, font que certains chercheurs se sont mis à la recherche de vaccins alternatifs (Antonis et al., 2006). Ainsi, il a été démontré que les particules virales (VLP) produites avec le système baculovirus constituent de bons candidats pour la vaccination humaine ou vétérinaire. En effet, les produits exprimés présentent une forte immunogénicité, et le système, une haute productivité. De plus, comparés aux vaccins inactivés, les VLP ne nécessitent pas la propagation de virus infectieux, ne présentent pas de risque de transmission ou d'infection, les niveaux de production sont bien plus élevés et les prix de production sont plus faibles. Enfin, les VLP imitent morphologiquement les virions authentiques et sont vraiment stables dans des conditions environnementales extrêmes (Antonis et al., 2006).

La vaccination contre le PPV chez le porc se fait par voie parentérale, mais le PPV comme d'autres pathogènes, débute son cycle infectieux à la surface des muqueuses et plus spécifiquement à la surface épithéliale des muqueuses intestinales (Yigang et Yijing, 2008). Ce constat a amené les chercheurs à s'intéresser au développement de nouveaux vaccins qui induiraient une réponse immunitaire protectrice, non seulement à un niveau systémique, mais aussi à un niveau mucosal, et ceci dans le but d'empêcher le PPV d'utiliser les muqueuses comme un site de réplication continue et de dissémination à d'autres tissus. Une approche prometteuse pour amener les antigènes aux muqueuses consiste à utiliser des bactéries vivantes telles que *Lactobacillus casei* comme véhicule transporteur des antigènes. Il a récemment été démontré que l'administration intragastrique de bactéries produisant à leur surface ou sécrétant la protéine VP2, était capable d'induire une réponse immunitaire contre cette protéine avec la production d'anticorps capables de neutraliser le PPV (Yigang et Yijing, 2008).

V. Premières étapes de l'infection parvovirale

V.1. De la surface cellulaire au système endosomal

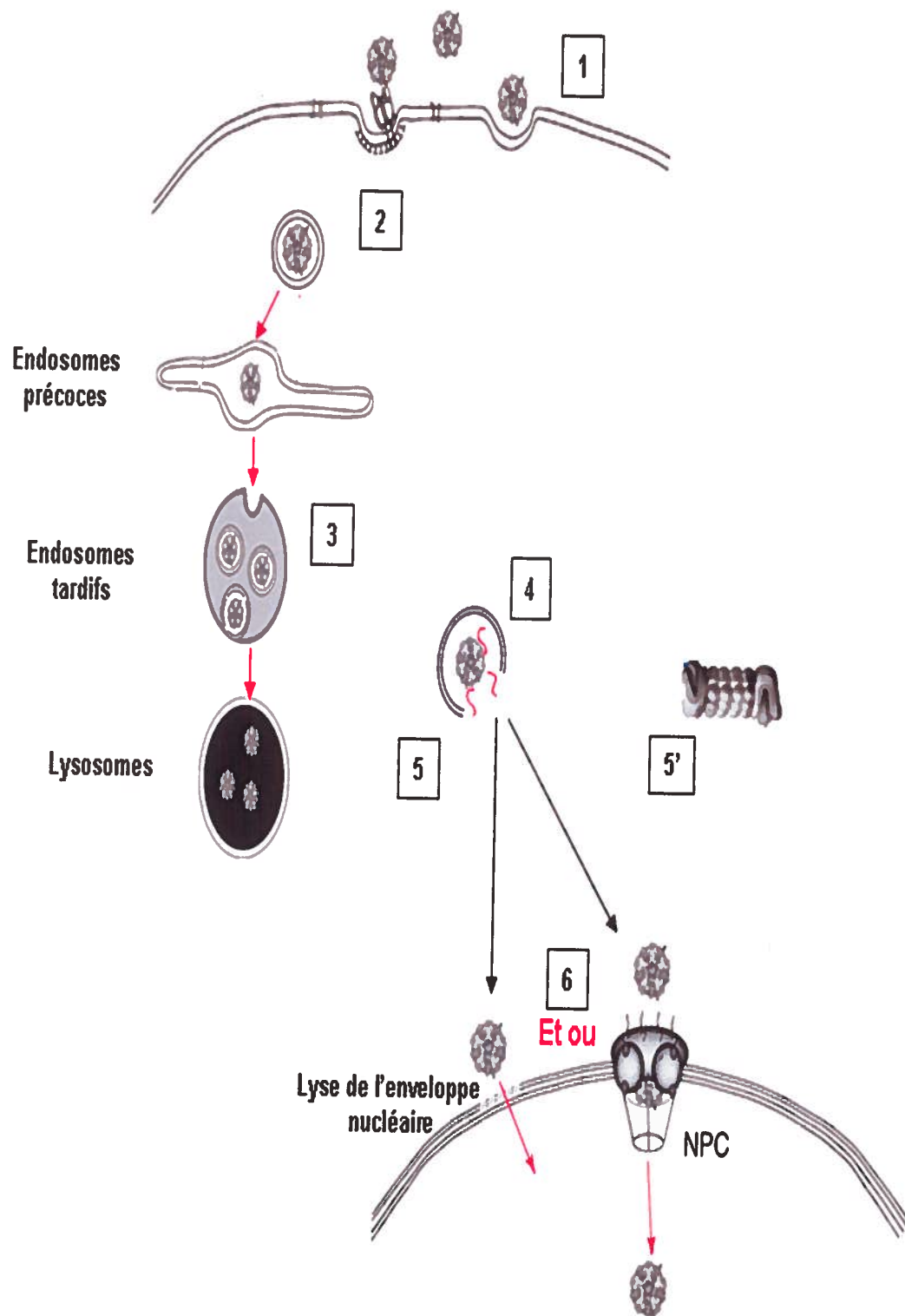
En se basant surtout sur des connaissances acquises chez les parvovirus du même genre que le PPV, la première étape de l'infection se ferait par la liaison du virus à l'acide sialique. En effet, l'acide sialique est un facteur commun d'attachement pour les parvovirus infectant différentes espèces, cette liaison se fait au niveau de la fossette de la capside parvovirale tel qu'il a été démontré pour le MVM (Nam et al., 2006), le CPV et le FPV. Il faut cependant souligner, que cette interaction n'est pas essentielle à l'infection de certains types cellulaires (Barbis et al., 1992). Chez le PPV, le récepteur n'a toujours pas été identifié à ce jour, mais une étude a permis de mettre à jour un anticorps capable de se lier à un polypeptide de 40 kDa, situé sur différents types cellulaires, et capable d'inhiber la production de plusieurs isolats de PPV (Harding et Molitor, 1992).

La liaison du parvovirus à son récepteur est suivie par l'endocytose possiblement par clathrine (Vihinen-Ranta et al., 2004) ou par d'autres voies, telles que la pinocytose non spécifique ou des mécanismes clathrine indépendants moins bien définis (Harbison et al., 2008), puis, par le transport du complexe dans le système endosomal. La capside du CPV a pu être localisée dans les endosomes tardifs, de même que dans les lysosomes (Suikkanen et al., 2002). Le PPV co-localise avec des protéines spécifiques de ces deux compartiments (Zadori et al., 2001) et l'infection parvovirale est bloquée en neutralisant le faible pH du système endosomal avec du chlorure d'ammonium ou de la bafilomycine A1 (cependant il n'est pas clair si cela est dû à des effets directs sur la capside ou aux altérations indirectes dans le trafic endosomal) (Harbison et al., 2009).

La région unique de VP1 est exposée lors de l'acidification des endosomes et ceci sans désintégration de la capside virale, ce qui permet à l'activité PLA2 de modifier la membrane des endosomes pour permettre l'échappement du virus (Zadori et al., 2001; Farr et al., 2005) (*figure 3*). Cet échappement se ferait en créant un pore dans la membrane endosomale, sans pour autant induire sa destruction, puisque ni l'alpha sarcine ni les larges dextrans n'entrent dans le cytoplasme avec les capsides virales (Suikkanen et al., 2003).

Figure 3 : Premières étapes de l'infection

- (1)** Liaison du PPV à l'acide sialique et ou un récepteur spécifique encore inconnu.
- (2)** Endocytose possiblement médiée par clathrine, et (ou) pinocytose non spécifique et (ou) des mécanismes clathrine indépendants moins bien définis.
- (3)** Passage du virus dans la voie endosomale où la partie N-terminale de la protéine VP2 est clivée, si cela n'a pas déjà été réalisé hors de la cellule (perte du signal putatif SEN de VP2 par le virus). De plus, VP1-Up est externalisée.
- (4)** Echappement de la voie endosomale grâce à l'activité PLA2 de VP1-Up.
- (5)** Adressage nucléaire permis par le signal SLN de VP1-Up et le fait que le signal SEN de VP2 a été préalablement clivé. Le transport nucléaire se ferait via les microtubules.
- (5')** Possible intervention du protéasome à Ubiquitine durant le trajet vers le noyau.
- (6)** Plusieurs mécanismes possibles s'excluant ou complémentaires pour amener le génome au noyau :
 - Lyse de l'enveloppe nucléaire puis entrée du virus dans le noyau et libération du génome.
 - Amarrage du virus au pore nucléaire, entrée puis libération du génome.
 - Amarrage du virus au pore nucléaire et libération du génome à ce niveau sans entrée.



Le pH endosomal aurait aussi un rôle dans le clivage de la partie N terminale de VP2 et donc du signal du putatif d'export nucléaire (Mani et al., 2006). Le clivage préalable de la partie N-terminale de VP2 est nécessaire pour qu'une externalisation correcte de la partie N-terminale de VP1 ait lieu correctement (Farr et al., 2006).

V.2. La livraison du génome viral au noyau

Une fois dans le cytosol, les capsides de certains parvovirus sont affectées par l'activité du protéasome à ubiquitine (Ros et Kempf, 2004). Les signaux de localisation nucléaire de VP1-Up permettraient à la capside virale d'être amenée à la membrane nucléaire et (ou) d'être amarrée au pore nucléaire. Le faible diamètre de la capside parvovirale devrait en théorie permettre à celle-ci de passer intacte le complexe du pore nucléaire, et ceci a déjà été observé pour les capsides nouvellement formées lors de la sortie virale chez le MVM. Certaines expériences indiquent un mécanisme d'entrée indépendant du complexe de pore nucléaire (CPN). En effet, une destruction de l'enveloppe nucléaire externe a été observée quand les capsides de MVM ont été microinjectées dans le cytoplasme d'oocytes de Xénopes, et le fait d'ajouter des éléments bloquant le pore nucléaire, n'empêche pas l'entrée nucléaire des capsides injectées, ce qui indique un mécanisme d'entrée indépendant du CPN (Harbison et al., 2008).

Le mécanisme de libération d'ADN dans le noyau n'est pas non plus très bien compris, mais il est clair que les particules virales sont suffisamment robustes et le désassemblage complet ne serait pas nécessaire pour la libération du génome. Par conséquent, le génome pourrait être extrait des capsides relativement intactes. Ainsi, pour le MVM, l'utilisation de sondes fluorescentes pour l'extrémité 5' du génome a permis de montrer une exposition partielle de l'ADN dans le cytoplasme et l'utilisation d'une sonde pour l'extrémité 3' a aussi montré que celle-ci aussi était exposée à l'extérieur de la capside. Chez le MVM, les protéines de la capside n'ont cependant pas été détectées dans le noyau, ceci, pourrait simplement indiquer un faible taux de transfert nucléaire, ou bien que les capsides libèrent le génome au niveau du CPN. Les capsides de PPV microinjectées semblent entrer intactes dans le noyau mais après un délais de trois à six heures et pour la plus part des parvovirus, la quantité de capside qui entre dans la noyau est probablement faible et la majorité semble persister dans la zone périnucléaire, et ceci durant plusieurs heures (Vihinen-Ranta et al., 2004; Harbison et al., 2008) (*figure 3*).

VI. Etapes de la réplication parvovirale

VI.1. Nécessité de la phase S cellulaire

Contrairement à d'autres types de virus, les parvovirus sont incapables d'activer la synthèse d'ADN dans les cellules hôtes. Ainsi pour permettre la réplication virale, les cellules infectées doivent être activement mitotiques, ce qui est le cas des cellules embryonnaires, fœtales ou encore des cellules hématopoïétiques, ciblées par le PPV. L'incapacité à forcer la cellule hôte à entrer en phase S, signifie que les parvovirus ne sont pas tumorigènes, mais au contraire ils seraient oncolytiques avec une forte tendance à se répliquer préférentiellement dans des cellules à phénotype transformé. Ainsi, l'idée d'utiliser ces virus dans la lutte contre le cancer a vu le jour (Shaughnessy et al., 1996).

Une fois la phase S atteinte, la machinerie cellulaire peut convertir l'ADN simple brin du virus en ADN double brin qui servira de matrice pour la transcription virale. Pour cela, il y a utilisation de l'extrémité 3' du génome. Cette dernière permet, en effet, la formation d'un palindrome en forme de Y (117 nu) qui sert d'amorce pour la génération du double brin précédant la transcription. De plus, ce palindrome possède une structure caractéristique complexe lui permettant de lier de manière sélective des facteurs de transcription et des facteurs modulateurs de transcription (Tijssen et al., 1995).

VI.2. Transcription épissage et produits protéiques

Le génome du PPV code pour plusieurs protéines dont deux structurales et trois non structurales. Les protéines sont issues de deux grands cadres ouverts de lecture (ORF): un cadre de lecture gauche permettant la production des protéines non structurales et un cadre de lecture droit pour la production de protéines structurales.

La transcription virale est sous le contrôle de deux promoteurs : le premier P4, situé à la position 196, ce promoteur permet la synthèse d'un ARN primaire à partir de la position 225 (cet ARN permet la production des protéines non structurales NS1, NS2 et NS3), et le second P40, situé à la position 2004, ce promoteur permet la synthèse d'un ARN primaire à partir de la position 2035 (cet ARN permet de produire les protéines structurales VP1 et VP2) (Tijssen et al., 1995) (*figure 4*).

Figure 4 : Transcription épissage et produits protéiques

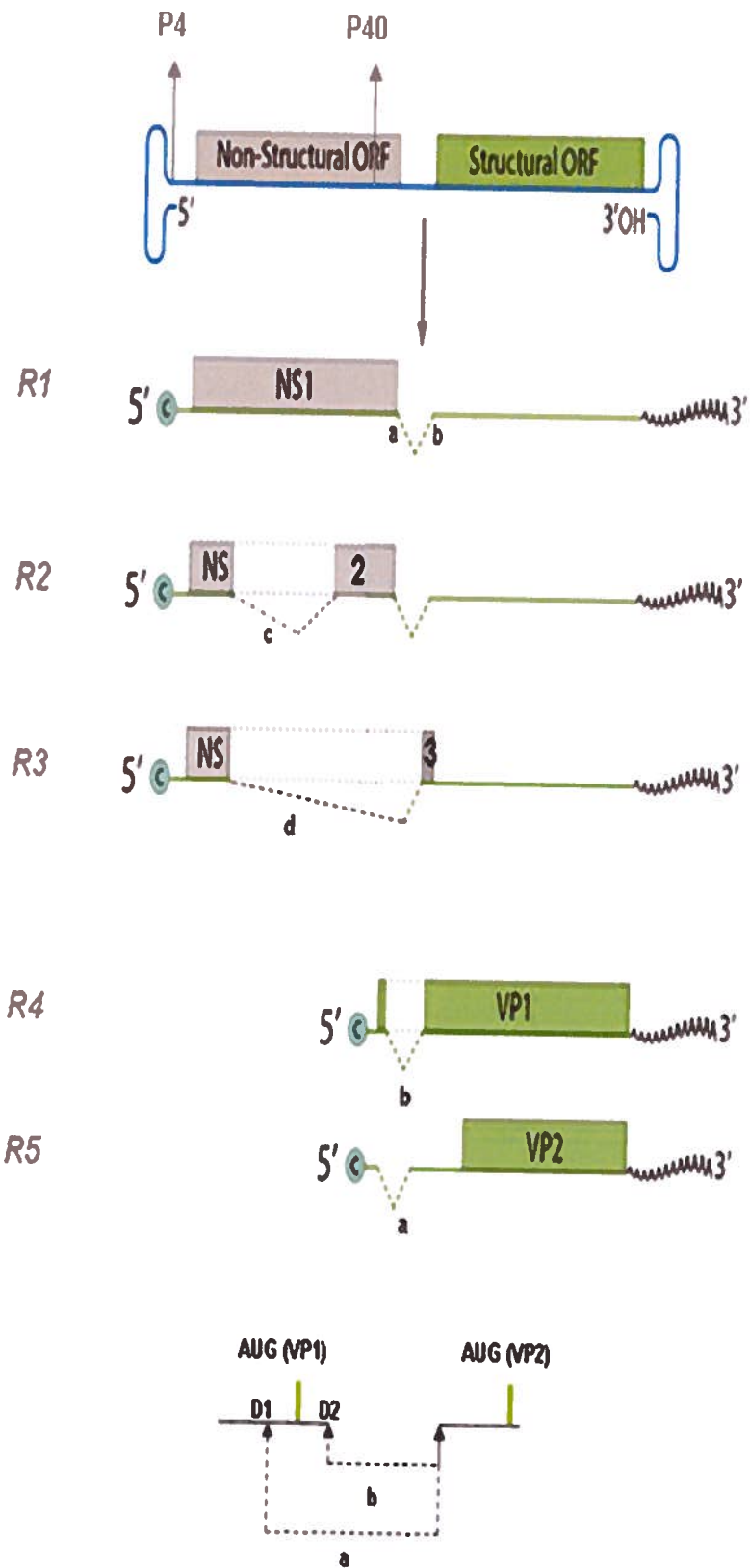
Deux transcrits primaires sont synthétisés à partir des promoteurs P4 et P40 et sont alors polyadénylés en position 4833 et "coiffés".

L'épissage alternatif du pré-messager P4 aboutit à la formation de 3 ARN messagers R1 (4,7 kb), R2 (3,3 kb) et R3 (2,9 kb), tandis que l'épissage alternatif du pré-messager P40 donne deux ARN messagers R4 et R5 (2,9 kb).

L'épissage fait intervenir deux petits introns a et b, un grand intron c et une région d. Les petits introns a et b possèdent un site accepteur commun situé en amont du codon d'initiation de traduction de VP2, mais possèdent deux sites donneurs différents D1 et D2 : D1 est situé en amont du codon d'initiation de traduction de VP1 tandis que D2 se trouve en aval. De plus la force du site D1 permet une prévalence du messenger R5 par rapport au messenger R4.

L'épissage de la région d se fait entre le site donneur du grand intron c et le site accepteur des petits introns (a et b). Cet épissage permet donc un saut d'introns.

Les ARN messagers R1, R2 et R3 permettent respectivement la synthèse des protéines NS1, NS2 et NS3, tandis que les ARN messagers R4 et R5 permettent la synthèse des protéines structurales VP1 et VP2.



Comme d'autres parvovirus, le PPV utilise l'épissage alternatif pour accroître la capacité codante de son génome compact (Pintel et al., 1995). Ainsi, les deux transcrits primaires subissent un épissage qui va aboutir, au total, à la formation de cinq transcrits polyadénylés en position 4833. L'épissage de l'ARN primaire du promoteur P4 permet la formation de 3 ARN messagers R1 (4,7 kb), R2 (3,3 kb), R3 (2,9 kb), tandis que l'épissage de l'ARN primaire issu du promoteur P40 permet la formation de deux ARN messagers R4 (2,9 kb) et R5 (2,9 kb) (Tijssen et al., 1995; Bergeron et al., 1993)

L'ARN pré-messenger P40 comporte deux petits introns a et b que l'on retrouve aussi sur l'ARN pré-messenger P4. Ces deux petits introns ont la caractéristique de se chevaucher et d'avoir un même site accepteur, ainsi, l'intron a, possède le site donneur D1 situé à la position 2280-AG/GT et l'intron b possède le site donneur D2 situé à la position 2313-AG/GT. Les deux introns ont le même site accepteur situé à la position 2386-AG/G. (Tijssen et al., 1995).

Le site donneur D1 se trouve en amont du codon d'initiation de la traduction de la protéine de structure VP1, alors que le site donneur D2 se retrouve en aval de ce codon d'initiation de la traduction. L'épissage alternatif de ces deux introns va donc permettre de générer les deux transcrits R4 et R5, l'un permettant la traduction de la protéine de structure VP1 tandis que l'autre permettra la production de la protéine de structure VP2. La force des sites donneurs va permettre de moduler l'expression de ces deux protéines de structure, avec une prévalence pour la protéine VP2.

D'autre part, on peut voir que ces deux petits introns se retrouvent en aval du codon stop de traduction des protéines non structurales. Chez le MVM, il existe deux sites accepteurs pour les petits introns a et b et le codon stop de NS2 se retrouve entre ces deux sites. L'épissage alternatif des deux petits introns a et b aboutit donc chez le MVM à la formation de plusieurs isoformes de la protéine NS2 avec des parties C-terminales différentes. (Tijssen et al., 1995).

L'épissage d'un grand intron C du pré-messenger P4 aboutit à la formation du transcrit R2 qui, après traduction, va permettre la production de la protéine NS2.

L'épissage d'une région D du pré-messager P4, se fait entre le site donneur du grand intron C et le site accepteur des petits introns, et permet ainsi, un saut d'introns. Cet épissage aboutit à la formation du transcrit R3, qui va permettre la production de la protéine NS3. De plus, cette protéine n'existe pas chez le MVM et elle serait apparue chez le PPV pour compenser l'absence d'isoformes de NS2. Enfin, le transcrit R1, quant à lui, permet la synthèse de la protéine NS1. Ce transcrit ne comporte aucun épissage dans son cadre de lecture (Tijssen et al., 1995).

En 2005 il a aussi été observé que le génome de tous les parvovirus contenait une petite ORF appelée SAT (Small Alternatively Translated protein), située à environ 60 codons directement après le codon d'initiation de VP2. Des constructions permettant la fusion avec la protéine GFP ou un flag ont permis, d'une part, de démontrer que cette protéine est bel et bien exprimée et, d'autre part, que contrairement aux autres protéines non structurales, la protéine SAT est exprimée de manière tardive, à partir du moment où son expression est réalisée à partir du même ARNm que VP2 (Zadori et al., 2005).

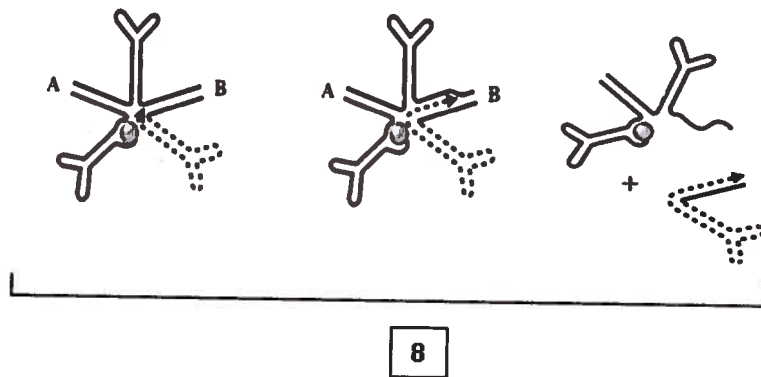
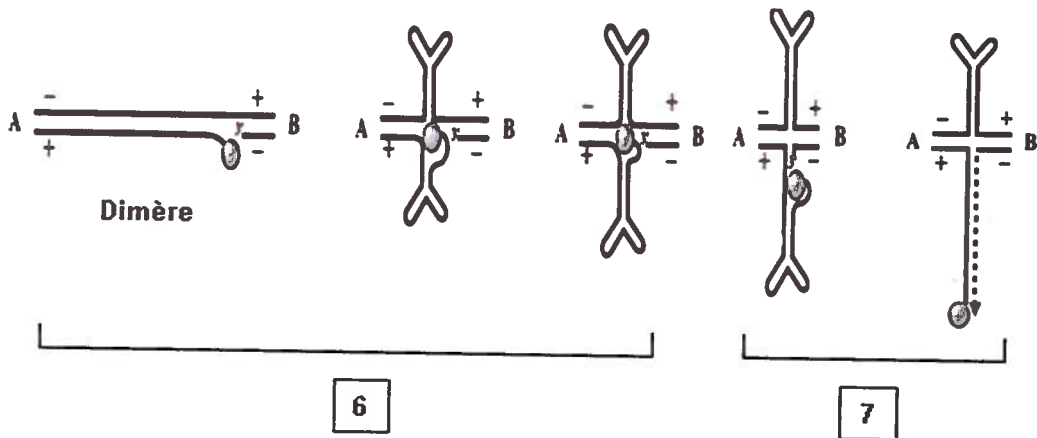
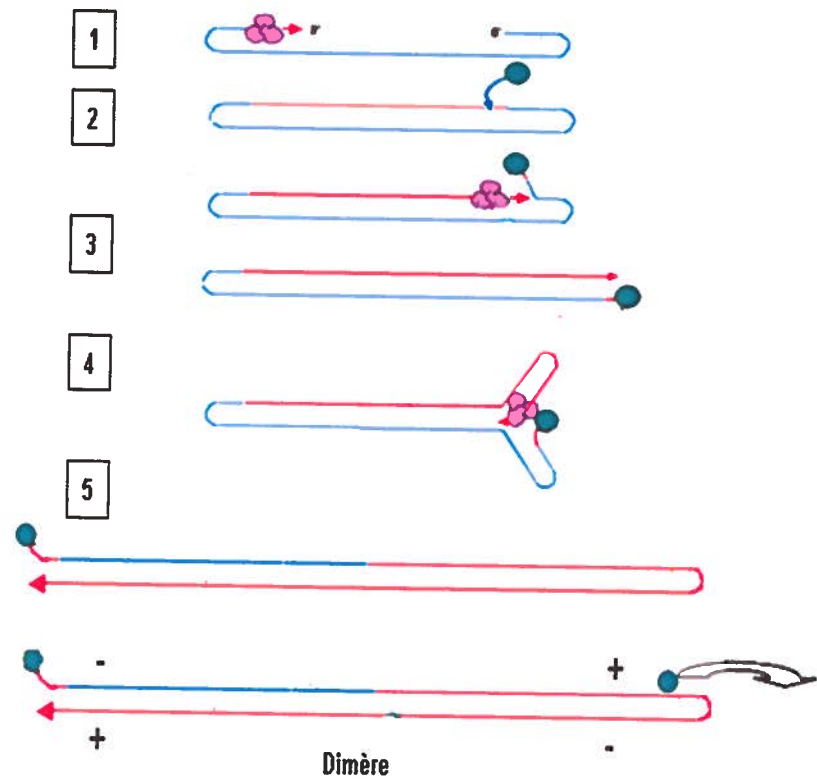
VI.3. Modèle de réplication du génome parvoviral

Contrairement aux autres protéines virales produites par le PPV, la protéine NS1 (une phosphoprotéine de 84 kDA) a une très grande homologie avec des protéines similaires provenant d'autres parvovirus, c'est pour cette raison que ces protéines NS pléotropiques sont suspectées d'avoir de nombreuses fonctions en commun. (Tijssen et al., 1995). La protéine NS1 possède un grand nombre de fonctions telles que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, une activité hélicase (Jindal et al., 1994), la capacité d'oligomérisation (Pujol et al., 1997), l'interaction site-spécifique avec l'origine virale (Mouw et Pintel, 1998), et une activité endonuclease site et sens-spécifique (Christensen et al., 2001) (Nuesch et al., 1995). Toutes ces fonctions confèrent à NS1 la capacité d'initier la réplication du génome viral (Christensen et Tattersall, 2002) (*Figure 5*).

L'épingle de l'extrémité 5' (220 nu) en forme de croix, joue un rôle crucial dans la réplication virale grâce à un mécanisme d'épingle à cheveux roulante. De plus, à l'extrémité 5', en amont de l'épingle, on retrouve une région dite unique de 60 pb et une région répétée de 127 paires de bases (Tijssen et al., 1995).

Figure 5 : Réplication du génome parvoviral

- (1) La machinerie cellulaire notamment l'ADN polymérase eucaryote synthétise le brin complémentaire à partir de l'extrémité 3' du génome simple brin négatif du virus, donnant ainsi un génome double brin.
- (2) La NS1 se lie de manière spécifique à l'origine virale et initie la réplication en introduisant une coupure simple brin dans le génome. Cette réaction laisse NS1 attachée de manière covalente à l'extrémité 5' du site de coupure.
- (3) La protéine NS1 probablement par son activité hélicase permet de défaire l'épingle à cheveux, et la polymérase eucaryote peut alors continuer à synthétiser le brin complémentaire.
- (4) La partie terminale néo-synthétisée prend à l'aide de l'activité hélicase de NS1 une forme « d'oreilles de lapin », permettant le repositionnement de la fourche de réplication.
- (5) La polymérase eucaryote peut alors continuer à synthétiser, processus aboutissant à la formation d'un dimère.
- (6) La voie de résolution hétérocruciforme commence par la coupure du dimère dans le bras B par la protéine NS1, il s'en suit un repliement en forme de croix, permis par l'activité hélicase de NS1.
- (7) L'extrémité 3' de brin négatif du bras B s'hybride à son complémentaire positif du bras A permettant la synthèse par l'ADN polymérase du complémentaire négatif.
- (8) Etapes de réarrangement, de synthèse par la polymérase et déplacement.



Le rôle exact de ces deux régions n'est pas encore très clair mais elles pourraient intervenir lors de la réplication.

Le modèle de réplication du génome parvoviral suggéré il y a 30 ans, a été décrit par Cotmore, Tattersall (Cotmore et Tattersall, 1995) et Berns (Berns, 1990). Le fait que le génome du PPV, comme celui du MVM, soit asymétrique avec un palindrome en Y et un palindrome en croix avec des mis-appariements (bubbles), peut faire penser que la réplication des ces deux virus possède des similarités (Bergeron et al., 1993). Ainsi, après que l'ADN polymérase eucaryote ait synthétisé en phase S le brin complémentaire à partir de l'extrémité 3' du génome viral, celui-ci va pouvoir être transcrit et la protéine NS1 va pouvoir être traduite. NS1 se lie de manière spécifique à l'origine virale et initie la réplication en introduisant une coupure simple brin dans le génome. Cette réaction laisse NS1 attachée de manière covalente à l'extrémité 5' du site de coupure via une liaison phosphotyrosine, et l'extrémité 3' hydroxyle du site de coupure, restée libre, sert alors d'amorce pour la synthèse d'ADN. Le génome linéaire se réplique en passant par une série d'intermédiaires concatamériques par un mécanisme de réplication "rolling-hairpin", dans lequel, la fourche de réplication est basculée en arrière et avance le long du génome par réarrangement des palindromes terminaux (Christensen et Tattersall, 2002). La réplication du PPV comme celle du MVM pourrait faire intervenir une voie de résolution hétérocruciforme consécutive à la formation des dimères. Ces intermédiaires font intervenir l'activité hélicase de NS1 (Cotmore et Tattersall., 2003) (*Figure 5*).

VI.4. Protéines non structurales : fonctions potentielles dans le cycle viral

Peu d'études ont été réalisées concernant les protéines non structurales chez le PPV, ainsi, la plupart des informations proviennent d'études effectuées chez des parvovirus qui lui sont très proches tels que le MVM, CPV et le FPV.

Dans le cycle viral (*Figure 6*), les protéines non structurales sont les premières à être traduites puis s'accumulent. Cette accumulation est toxique pour la cellule (Cotmore et al., 1995). Les vaccins inactivés ne stimulent pas la production d'anticorps contre les protéines non structurales. Ainsi la protéine NS1 produite, purifiée et caractérisée en

bactéries pourrait comme outil de diagnostic permettre de différencier les animaux infectés des animaux immunisés (Qi et Cui. 2009).

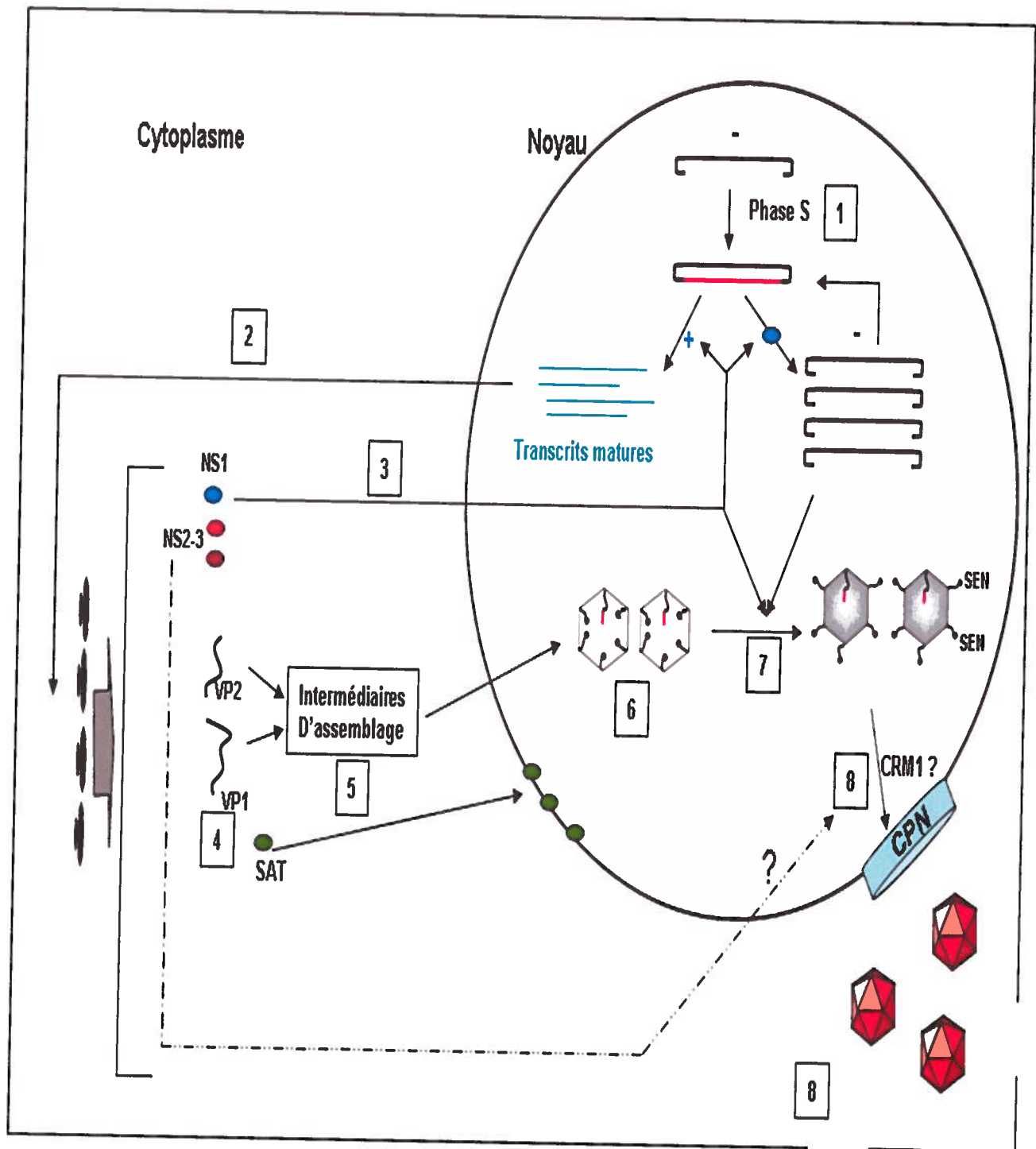
Outre le fait de permettre la réplication comme vu précédemment, et de par sa similarité avec les NS1 d'autres parvovirus, la protéine NS1 posséderait la capacité d'interagir avec des protéines cellulaires et d'induire la lyse cellulaire (Daeffler et al., 2003), ainsi que l'apoptose (Sol et al., 1999). Elle posséderait aussi un rôle important dans la régulation, la trans-activation et l'expression des gènes viraux (notamment le promoteur P40 des protéines structurales), car elle interagit avec le facteur de transcription SP1. Ainsi, des expériences d'échanges de domaines et de mutations par délétion, ont permis de démontrer que le domaine d'activation serait situé dans la partie C-terminale de NS1 (Kradny et Ward., 1995; Legendre et Rommelaere, 1994).

Le PPV encapside l'ADN simple brin de sens négatif de 3' vers 5' comme le MVM et ceci pourrait faire intervenir la protéine NS1 grâce à son activité hélicase et sa capacité à rester attaché à l'extrémité 5' de l'ADN (Cotmore et Tattersall, 1995). Suite à cette encapsidation, la particule virale pleine expose la partie N-terminale de VP2 qui contiendrait possiblement un signal d'export nucléaire, permettant l'export de la capside avant lyse (Maroto et al., 2004).

La protéine NS2 de 18KDa ne possède qu'un seul isoforme chez le PPV alors qu'elle en possède 3 chez d'autres parvovirus tels que le MVM. Cette absence d'isoformes pourrait être compensée par la présence uniquement chez le PPV de la protéine NS3 dont la fonction reste inconnue (Bergeron et al., 1993; Tijssen et al., 1995). Des mutants de NS2 ont démontré de multiples défaillances dans la réplication de l'ADN, dans la traduction et dans l'assemblage de la capside (Carter et Pintel, 1992; Cotmore et al., 1997) (Naeger et al., 1990; Naeger et al., 1993; Choi et al., 2005). Cette protéine aurait aussi un rôle dans la sortie de la capside du noyau (Eichwald et al., 2002 ; Miller et Pintel, 2002). Dans le but d'avoir une meilleure compréhension du rôle de NS2 durant la réplication virale, des études se sont focalisées sur la recherche de partenaires de liaison à cette protéine. Ainsi, il a été découvert que NS2 pouvait interagir avec au moins deux membres de la famille de

Figure 6 : Cycle global de réplication parvovirale

- (1) Une fois l'ADN simple brin de sens négatif du parvovirus porcin dans le noyau et la phase S atteinte par la cellule, la machinerie cellulaire va convertir l'ADN simple brin du virus en ADN double brin.
- (2) Le génome double brin sert alors de matrice pour la transcription des ARN codant pour les protéines non structurales qui sont alors épissés, capés, et polyadénylés puis transportés au cytoplasme où les protéines précoces NS1, NS2 et NS3 sont traduites.
- (3) NS1 va notamment permettre d'une part d'initier la réplication du génome parvoviral et d'autre part de trans-activer le promoteur P40.
- (4) La synthèse des protéines structurales VP1 et VP2 et la protéine non structurale SAT est permise grâce à la trans-activation du promoteur P40.
- (5) Les protéines VP1 et VP2 s'assemblent en intermédiaires d'assemblage qui sont transportés au noyau tandis que les protéines SAT se retrouvent dans la membrane du réticulum endoplasmique et du noyau où elle pourrait jouer un rôle dans la lyse cellulaire.
- (6) Les intermédiaires d'assemblage vont eux-même s'assembler en capsides vides ou les parties N terminales de VP1 et de VP2 se trouvent à l'intérieur des capsides.
- (7) L'encapsidation des ADN simples brins de sens négatif est réalisée possiblement grâce à NS1 ce qui permet l'externalisation des parties N-terminale de VP2, celles-ci contiendraient un signal putatif d'export nucléaire.
- (8) La sortie des virions de la cellule pourrait se faire de deux manières complémentaires:
L'une, utilisant le signal d'export nucléaire putatif de la capside pleine, ce mécanisme pouvant faire intervenir les protéines non structurales NS2, 3 et (ou) les protéines CRM1 avec une sortie virale qui se ferait avant la lyse cellulaire.
L'autre faisant intervenir la lyse cellulaire induite directement ou indirectement par les protéines NS1 et SAT.



protéines 14-3-3 (Brockhaus et al., 1996), de même qu'avec la protéine SMN (Young et al., 2002), ainsi qu'avec le facteur d'export nucléaire CRM1, pour passer du noyau au cytoplasme (Bodendorf et al., 1999; Ohshima et al., 1999). La liaison à CRM1 est réalisée grâce à une séquence d'export nucléaire conventionnelle NES (Eichwald et al., 2002; Miller et Pintel, 2002).

La protéine SAT découverte en 2005 a été prédite comme contenant une région en hélice lui conférant la propriété d'être une protéine trans-membranaire. Ainsi, des mutations dans cette région hydrophobe ont affecté la localisation de cette protéine. De plus, SAT co-localise avec la calréticuline dans la membrane du réticulum endoplasmique et du noyau. Cette protéine causerait un stress entraînant la lyse cellulaire et pourrait jouer un rôle dans l'échappement du virus au système immunitaire (Zadori et al., 2005).

L'ensemble des étapes du cycle viral a été répertorié dans la (*Figure 6*). Cette figure regroupe certaines étapes qui ont été décrites notamment concernant les fonctions possibles des protéines NS. Cependant, certaines de ces informations sont des extrapolations provenant d'autres parvovirus et sont encore à l'état d'hypothèses qui restent à vérifier pour le PPV. Concernant la sortie virale de la cellule, celle-ci se ferait par voie de la lyse cellulaire compte tenu de l'effet cytopathique du PPV. Cependant, de récentes recherches indiquent que les nouveaux virions pourraient aussi sortir avant la lyse cellulaire (Bar et al., 2008).

VII. Facteurs influençant la permissivité cellulaire au PPV

Les cellules ST (Swine testicle) et les cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney), diffèrent dans leur capacité à permettre la réplication du parvovirus porcin. La comparaison des événements de la réplication virale intervenant dans les cellules ST (type cellulaire permissif) et ceux intervenant dans les cellules MDVK (type cellulaire non permissif) a été réalisée dans le but d'élucider les mécanismes possible conduisant à cette restriction de la réplication du PPV. Il a ainsi pu être montré que les virus radiomarqués se liaient à la surface des deux types cellulaires, de manière égale, et que cette liaison était PPV spécifique, indiquant que la restriction ne se faisait pas au niveau de la surface

cellulaire. Par contre, la synthèse d'ADN viral est limitée dans les cellules MDCK, de même que le taux d'ARN viral, ainsi que l'expression d'antigènes viraux (Oraveerakul et al., 1992).

VIII. Structure de la capside du PPV

VIII.1. Généralités

La structure de la capside du parvovirus porcin exprimée en système baculovirus a été déterminée par cristallographie aux rayons X avec une résolution de 3.5Å (**Figure 7**). Il a ainsi pu être montré que cette capside est similaire à celle d'autres parvovirus tels que les parvovirus canin (CPV), murin (MVM) ou encore félin (FPV) (Simpson et al., 2002). Une classification topologique basée sur la comparaison de surfaces de ces virus a permis de les assigner à un même groupe différent de celui du AAV2 ou du DNV (Padron et al., 2005). La capside non enveloppée de symétrie icosaédrique à triangulation (T1) et de diamètre 25 nm, est composée de 60 sous-unités protéiques faisant intervenir trois chaînes polypeptidiques (VP1, VP2 et VP3), dont la séquence de l'extrémité C-terminale est identique avec une structure secondaire caractéristique en baril beta, formé de neuf brins (A-I) β antiparallèles (Chapman et Rossmann, 1993).

VIII.2. Caractéristiques morphologiques

La capside possède trois axes de symétrie 2, 3 et 5, formés comme leur nom l'indique, respectivement par l'assemblage de deux, trois et cinq sous-unités protéiques. En observant la surface de la capside, on peut voir au niveau de l'axe de symétrie 2, une petite dépression appelée fossette, au niveau de l'axe de symétrie 3, une protubérance appelée spicule, et enfin au niveau de l'axe de symétrie 5, un cylindre (de feuillet β) au centre duquel un canal relie l'intérieur à l'extérieur de la surface du virion. Ce canal est entouré par une large dépression appelée canyon (Tsao et al., 1991) (**Figure 7**), et est occupé par une région riche en glycine, située à la partie N-terminale de VP2 et que l'on peut retrouver chez d'autres parvovirus (Chapman et Rossmann, 1993 et 95). Le clivage de la partie N-terminale de VP2 pour donner VP3 est réalisé uniquement si la capside contient

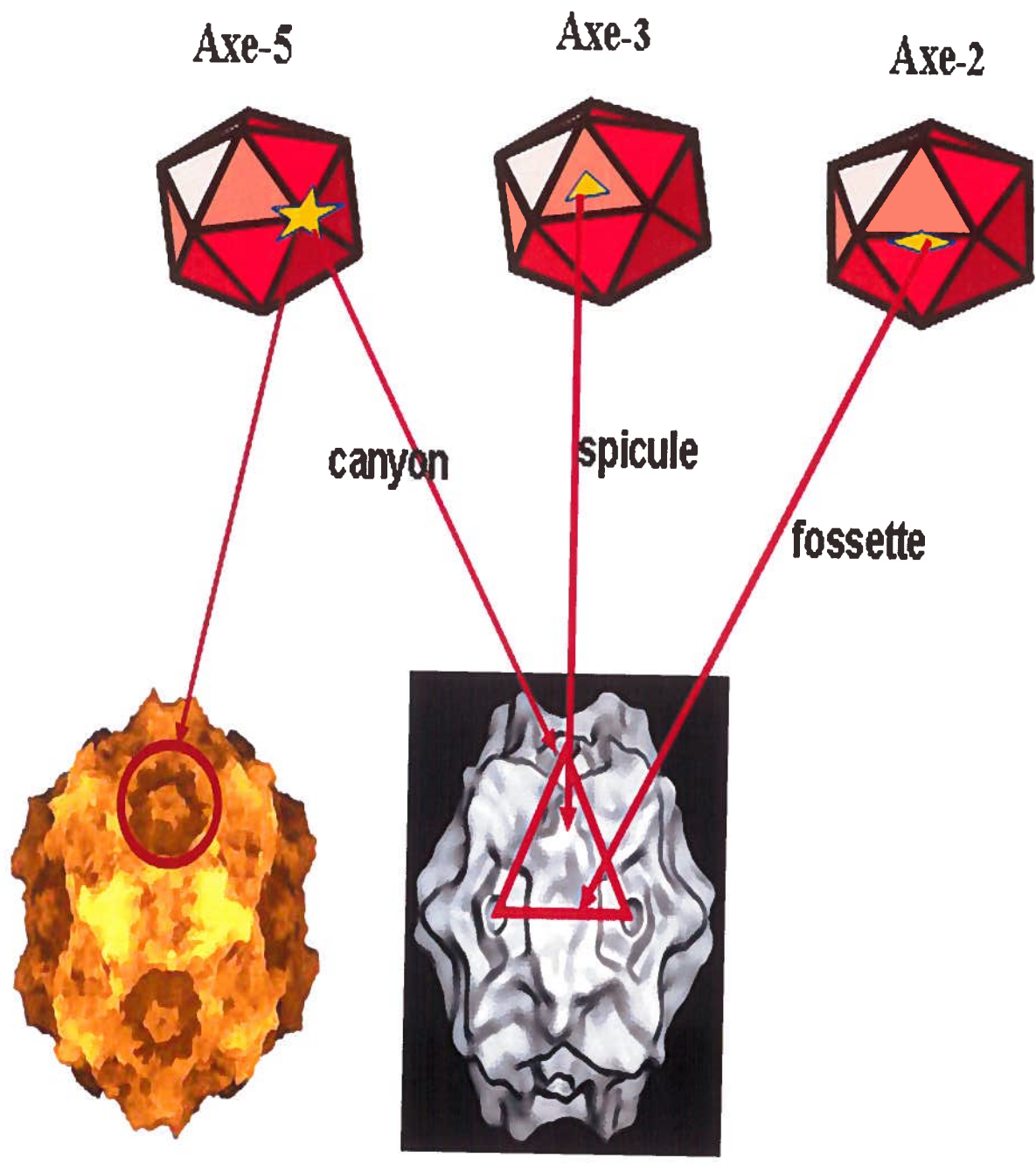
Figure 7 : Structure de la capside parvovirale

(A) La description de la surface de la capside parvovirale est réalisée grâce à une image obtenue à l'aide la microscopie cryoélectronique (à droite) ainsi que d'une image obtenue à l'aide de la structure cristallographique (à gauche) : on peut ainsi distinguer:

- 1- Une dépression appelée fossette au niveau de l'axe de symétrie 2;
- 2- Une protubérance appelée spicule au niveau de l'axe de symétrie 3;
- 3- Un canal entouré d'une large dépression appelée canyon au niveau de l'axe de symétrie 5. Ce canal est occupé par une région riche en glycine située à la partie N-terminale de VP2.

- (B)**
- 1) Représentation de 5 protéines (pentamère) formant l'axe de symétrie 5 au centre duquel se trouve un canal cylindrique.
 - 2) Représentation de 3 protéines (trimère) formant l'axe de symétrie 3 (superposées au pentamère en gris).
 - 3) Représentation de 2 protéines (dimère) formant l'axe de symétrie 2 (superposées au pentamère en gris).

A



B

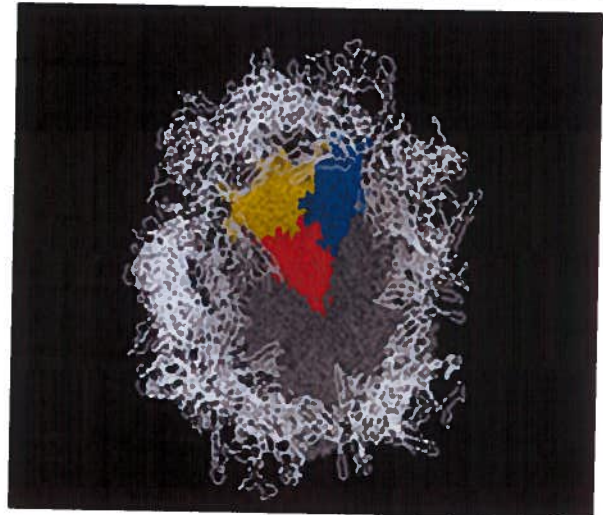
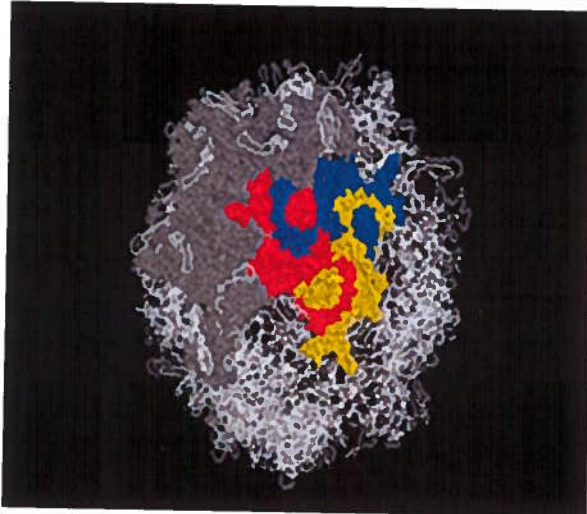
Vue extérieur de la capside

Vue intérieur de la capside

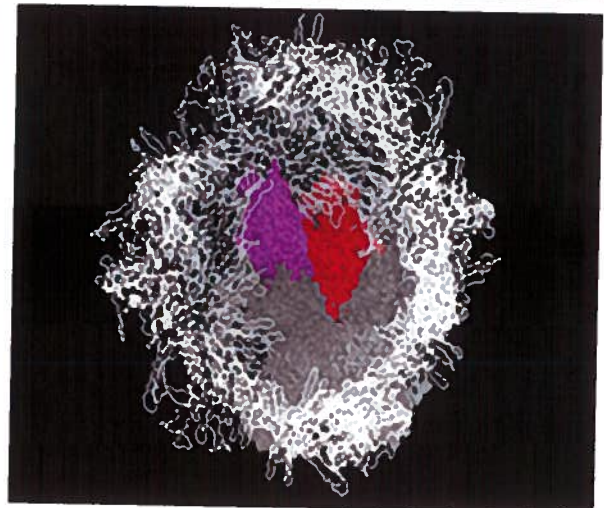
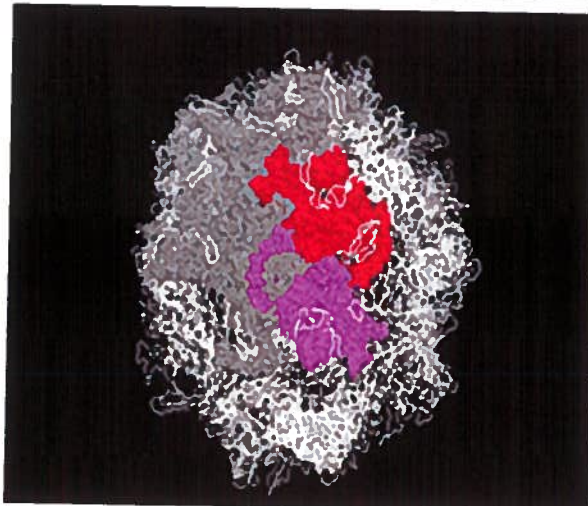
1 →



2 →



3 →



de l'ADN ce qui suggère que l'introduction d'ADN dans la particule permet l'externalisation de la partie N-terminale de VP2 à travers le canal, la séquence riche en glycine participant à cette externalisation (Agbandje et al., 1998). Il est à noter que la partie N-terminale spécifique de VP1 n'a encore jamais pu être résolue par cristallographie aux rayons X et ce pour aucun parvovirus à ce jour (Agbandje et al., 1993; Kaufmann et al., 2004; Simpson et al., 1998; Simpson et al., 2002; Tsao et al., 1991; Xie et al., 2002; Xie et Chapman 1996), car sa position est différente dans chaque particule et le nombre de copies est faible par particule (Kaufmann et al., 2008).

VIII.3. Stabilité et variabilité des acides aminés

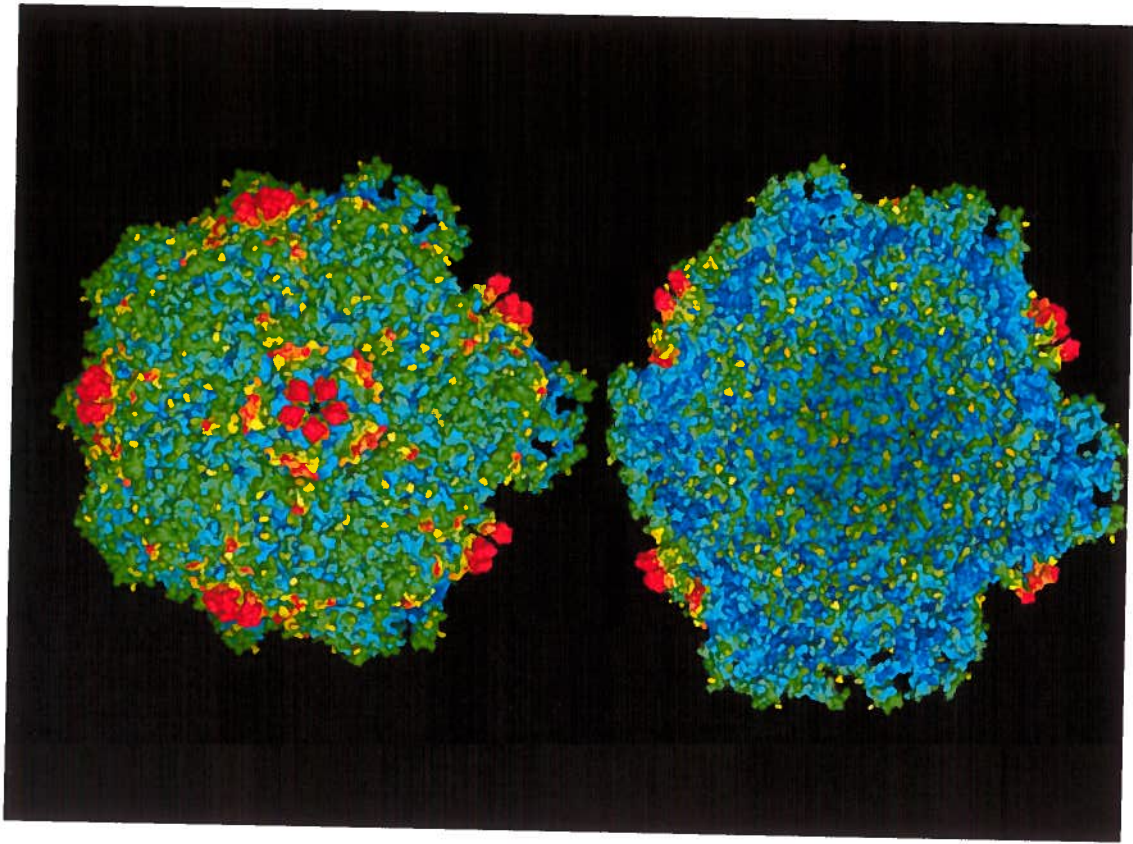
Si l'on observe la stabilité des acides à la face interne ou externe de la capside, on peut voir que le nombre d'acides aminés stables est plus grand à la face interne de la capside qu'il ne l'est à la face externe, l'instabilité étant plus grande au niveau de l'axe de symétrie 5, c'est-à-dire au niveau du canal et du canyon (**Figure 8**), ces instabilités pourraient être augmentées lors de la diminution du pH au niveau des endosomes et ainsi aider à l'externalisation de la VP1 de même qu'au clivage protéolytique de VP2 (Mani et al., 2006).

D'autre part cette instabilité de la face externe est aussi accompagnée par une variabilité des acides aminés entre différentes souches d'un même parvovirus ou par rapport aux autres parvovirus (CPV, MVM, FPV), la plupart des différences structurales étant probablement la cause des variabilités antigéniques connues et du spectre d'hôtes (Simpson et al., 2002). Ainsi, chez le CPV, de multiples acides aminés de la capside déterminent le spectre d'hôte (Chang et al., 1992; Parker et Parrish, 1997). Le FPV qui infecte des cellules félines en se liant au TfR félin mais qui est incapable de se lier au TfR canin, va entre les années 1976 et 1978, subir des changements dans les protéines de la capside, qui vont donner naissance à un ancêtre du CPV, capable lui, de se lier au TfR canin, d'infecter les cellules canines et d'induire des pathologies chez le chien. Cet ancêtre (CPV type-2) bien que capable de se lier au TfR félin, n'était plus capable d'infecter les chats, mais autour des années 1980, d'autres modifications d'acides aminés dans la capside vont amener à l'apparition de deux variants antigéniques CPV type-2a et 2b, mieux adaptés, qui vont pouvoir infecter les chats et les chiens (Hueffer et Parrish, 2003).

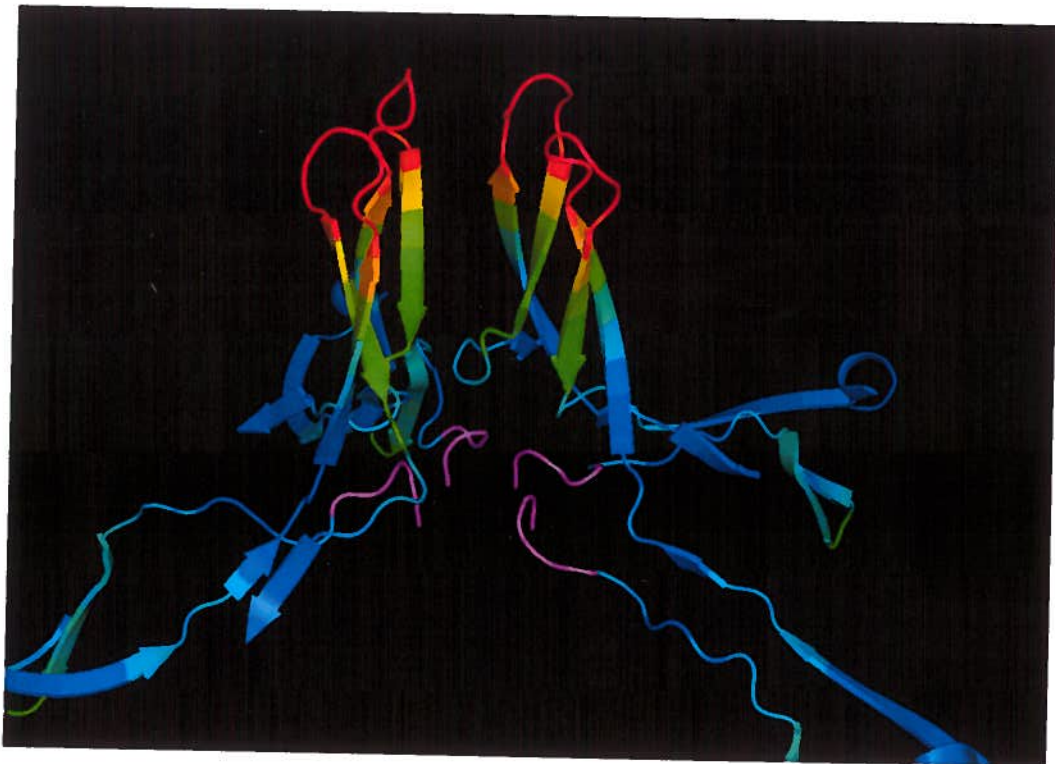
Figure 8 : Stabilité de la capsid

- (A) La stabilité de la capsid est représentée par un gradient de couleurs allant du bleu foncé pour les acides aminés les moins flexibles, au rouge pour les acides aminés les moins stables. Ainsi, la face externe (gauche) de la capsid est globalement plus flexibles que la face interne (droite), surtout au niveau de l'axe de symétrie 5.
- (B) Une coupe du pore nucléaire permet de voir où se situent plus exactement ces instabilités. Le pore est composé par un cylindre de feuillets β reliés entre eux par des boucles au niveau de la face externe de la capsid. Ce sont ces boucles qui sont les plus instables. De plus, les parties N-terminales des VP2 ont été colorées en violet, les 38 premiers acides aminés des parties N-terminales n'ont pas été résolus par cristallographie mais comme le montre la figure, ceux-là se trouvent en fait à l'intérieur de la capsid icosaédrique vide.

A



B



L'importance de la variabilité des acides aminés de la capside icosaédrique a encore récemment été démontrée par exemple chez le MVM où de très faibles changements dans la capside au niveau du site de liaison au récepteur (dépression de l'axe de symétrie 2 et dans le cas du MVM et l'acide sialique étant le récepteur) étaient responsables de la virulence de différentes souches (Lopez-Bueno et al., 2006).

Enfin et surtout, la comparaison de deux souches de parvovirus porcin NADL2 et Kresse, a permis de démontrer que leur différence de tropisme était influencée par la variation de 3 acides aminés situés à la surface de la capside, dont le premier (résidu 436) est situé près de la spicule de l'axe de symétrie 3 et les deux autres (résidus 378 et 383), près de la fossette de l'axe de symétrie 2 (Bergeron et al., 1996; Tijssen 1999; Simpson et al., 2002). Compte tenu des récentes découvertes concernant l'existence de recombinaison entre souches de PPV et l'apparition de nouveaux variants antigéniques (Shackelton et al., 2007; Zeeuw et al., 2007), il semble clair que le PPV pourrait comme d'autres parvovirus subir une évolution amenant une adaptation à de nouveaux types cellulaires ou hôtes.

IX. Assemblage de la capside

IX.1. Intermédiaires d'assemblage

D'un point de vue purement théorique, les trimères semblent être l'intermédiaire d'assemblage le plus stable. Ainsi, l'analyse du nombre et de la nature des acides aminés qui interviennent dans l'interaction entre les sous-unités formant un dimère, un trimère ou un pentamère, a permis de démontrer que les interactions qui forment un trimère sont les plus importantes (Wu et Rossmann, 1993; Chapman et Rossmann, 1993). D'autre part, l'entrelacement de boucles au sein du trimère confère à ce dernier une barrière énergétique de dissociation plus importante que celle que l'on peut retrouver au niveau des axes de symétrie 2 et 5 (Xie et Chapman, 1996).

D'un point de vue pratique, une faible quantité de trimères de VP2 ont été détectés dans des cellules exprimant des protéines de la capside sauvage du parvovirus canin (CPV). Le traitement à l'urée ou au pH de cette capside pleine a de même permis le

relargage de trimères et dans certains cas de pentamères (Yuan et Parrish, 2001). De plus, la mutation en alanine d'acides aminés situés à l'interface entre les trimères, a permis de mettre à jour certains acides aminés clefs qui interviennent dans l'assemblage et la stabilité de capsid du MVM (Reguera et al., 2004). La présence d'intermédiaire trimériques a même pu être observée lors d'expériences de réticulation des sous-unités et de sédimentation de certains mutants, dont l'assemblage a été empêché par des mutations à l'interface entre les trimères (Riolobos et al., 2006).

IX.2. Localisation cellulaire et structure des intermédiaires d'assemblage

Chez le MVM, la formation de trimère permettrait de créer des structures particulières à la surface des ces derniers, ces structures définissant des motifs de localisation nucléaire. Ainsi des mutations au niveau de ces MLN sont nécessaires mais insuffisantes pour empêcher la translocation nucléaire de tous les intermédiaires d'assemblage. En effet, les intermédiaires contenant VP1 sont trans-loqués, mais par contre, ils sont incapables de former des capsides vides dans le noyau (Lombardo et al., 2000, 2002).

La mutation du signal de localisation nucléaire de VP1 NLS, à elle seule, n'empêche pas la translocation nucléaire des intermédiaires d'assemblage. De plus, il y a assemblage de capsides dans le noyau. Par contre, la mutation du MLN, couplée à celle du SLN de VP1, empêche la translocation nucléaire de tous les assemblages. Ceci démontre un rôle complémentaire de ces deux signaux chez le MVM (Lombardo et al., 2002).

Il y a aussi le signal d'export qui serait situé à la partie N terminale de VP2. Cependant, pour que les intermédiaires d'assemblage puissent atteindre le noyau, il est important que celui-ci n'intervienne pas à ce stade du cycle viral. (Maroto et al., 2004).

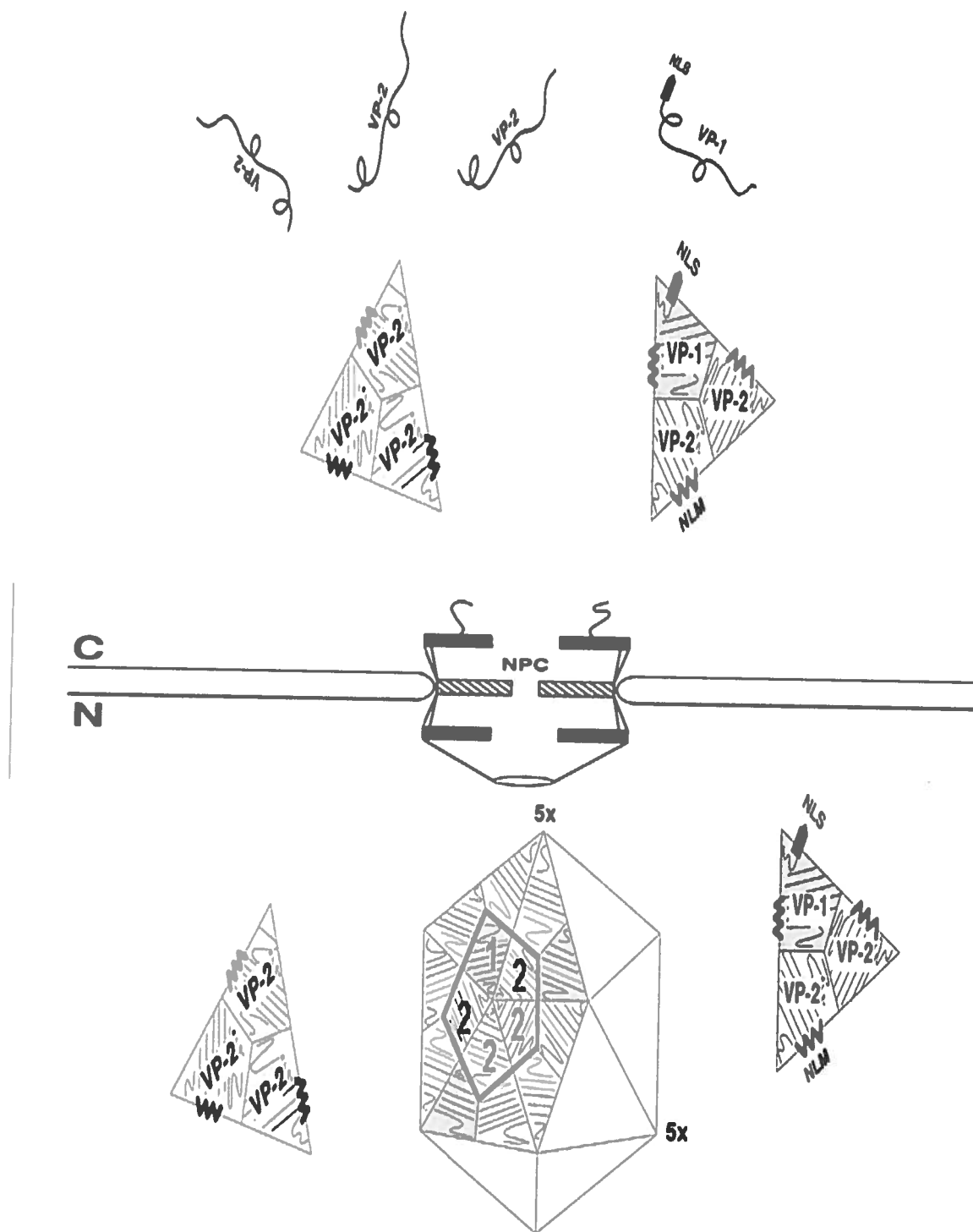
IX.3. Modèle hypothétique d'assemblage

Le modèle hypothétique d'assemblage tient, entre autre, compte tenue de la stabilité des intermédiaires d'assemblage ainsi que des expériences réalisées sur les motifs et signaux de localisation nucléaires chez le MVM. Le modèle a été émis pour la première fois par Lombardo et al., en 2000 (*figure 9*).

Figure 9 : Modèle hypothétique d'assemblage de la capside

Une fois dans le cytoplasme, les ARN messagers codant pour les protéines VP1 et VP2, sont traduits, puis il se formerait deux types intermédiaires d'assemblage: l'un constitué par un trimère de protéines VP2, tandis que le second serait constitué par deux protéines VP2 et une protéine VP1. Cette assemblage en trimère permettrait la formation de motifs de localisation nucléaires NLM, qui interviennent dans la translocation des trimères dans le noyau. Le signal de localisation nucléaire de VP1 interviendrait dans une moindre mesure dans ce transport.

Une fois dans le noyau les trimères s'assemblent en capsides vides, chaque sommet de capside constitué par un pentamère probablement de 4 protéines VP2 et 1 protéine VP1.



X. Etude structurale des virus

Il existe de nombreuses raisons qui poussent les chercheurs à étudier la structure des virus, et ceci constitue un sujet passionnant et complexe qui pourrait à lui seul faire l'objet d'un mémoire de recherche, ceci étant dit nous pouvons tout de même citer quelques notions.

Tout d'abord comme nous l'avons déjà vu dans les sections précédentes, il existe différents outils utilisés pour étudier la structure des virus et parmi ces derniers on retrouve la cristallographie aux rayons X, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la microscopie électronique ou encore la microscopie cryoelectronique.

L'étude structurale des virus s'intéresse non seulement à un aspect morphologique des virus, mais aussi à la structure de protéines virales, ainsi il existe des études importantes qui portent par exemple sur l'analyse structurale de la polymérase du virus l'hépatite C (Simister et al., 2009) ou d'autres virus, ces polymérases sont des cibles potentielles pour des antiviraux spécifiques, qui peuvent être découverts et surtout améliorés grâce à l'analyse structurale. Ces travaux ont donc des retombées dans ce qu'on appelle la conception rationnelle de médicaments.

L'étude de la structure des protéines membranaires des virus enveloppés est aussi très importante, puisque ce sont ces protéines qui permettent le premier contact entre les cellules cibles et le virus, et donc qui permettent les étapes précoces de l'infection des ces virus, ces protéines constituent là encore des cibles potentielles intéressantes pour la conception de médicaments.

L'étude de la structure des virus non enveloppés est aussi d'un grand intérêt puisque comme nous l'avons vu précédemment pour les parvovirus, de simples changements qui apparaissent dans la composition en acides aminés de la capside peuvent être responsables du tissu tropisme ou encore de l'adaptation d'un parvovirus à une autre espèce animale, ces capsides offrent donc un potentiel d'adaptation non négligeable à ces virus.

Les virus non enveloppés à symétrie icosaédrique tels que les parvovirus sont des virus qui sont particulièrement résistants aux conditions environnementales et expérimentales contrairement aux virus enveloppés, ceci explique en grande partie la raison pour laquelle la structure d'un grand nombre de ces virus a pu être résolue par cristallographie aux rayons X. Ainsi une base de données importante permet de regrouper un certain nombre de ces structures, il s'agit de la base de données VIPER (Reddy et al., 2001)..

Dans notre étude nous nous intéressons particulièrement à l'assemblage de la capside du parvovirus porcin, en effet l'étude de la morphogenèse des parvovirus pourrait permettre la mise au point d'antiviraux spécifiques permettant d'empêcher l'assemblage de ces virus. Pour l'étude de la morphogenèse nous disposons du modèle hypothétique précédemment décrit (figure 9)

Afin de conforter ce modèle hypothétique, nous avons émis l'hypothèse que si ce modèle est vrai, cela signifierait que les liaisons intra et inter-trimères devraient potentiellement faire intervenir des éléments structuraux importants et conservés nécessaires à la morphogenèse de la capside des parvovirus. Comprendre comment les protéines sont assemblées c'est-à-dire les contacts entre les trimères et intra-trimères est donc un travail essentiel.

Pour cela nous disposons des structures de parvovirus de la base de données VIPER et de différents logiciels de modélisation moléculaire.

MÉTHODOLOGIE

I. Les types cellulaires et bactériens

I.1. La culture routinière des cellules

Les deux types cellulaires utilisés dans ce travail sont les cellules d'insecte Sf9 (*Spodoptera frugiperda*) et les cellules de fibroblastes de testicules de porcs PT (Porcine Testis). Ces deux types cellulaires sont cultivés sous hôte à flux laminaire.

Les cellules Sf9 ont une croissance bien moins rapide que celle des cellules PT, elles possèdent aussi une plus faible adhérence. Ces cellules sont cultivées à 27°C dans du milieu SF900 II SFM (Gibco BRL). Lorsqu'elles atteignent les trois quart de la confluence d'un flasque de 75 cm² (contenant 12 ml de milieu), elles sont remises en suspension par grattage à l'aide d'un grattoir. Puis, les cellules sont homogénéisées par aspiration grâce à une pipette, et divisées en trois flasques de 75 cm² (4 ml/flasque complétés à 12 ml avec du milieu de culture à 20°C). Il faut environ 6 jours pour obtenir à nouveau des flasques à 3/4 confluents.

Les cellules PT quant à elles, sont cultivées dans du milieu de culture « Dulbecco's Modified Eagle Medium » DMEM (Gibco BRL), additionné de 7% de sérum de veau fœtal inactivé (Gibco BRL), 1% de L-glutamine 200 mM (Gibco BRL) et 1% Pénicilline/Streptomycine (10 U/μl Gibco BRL). La culture se fait à 37°C avec 5% de CO₂.

Lorsque les cellules PT atteignent les 3/4 de confluence dans un flasque de 75 cm² (contenant 10 ml de milieu), le milieu de culture est retiré et les cellules sont lavées avec 10 ml PBS 1X (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco BRL). Ensuite, 2 ml de trypsine 1X (Gibco BRL) sont rajoutés sur les cellules pour permettre de les décoller. La trypsine est laissée de 5 à 10 minutes à 37°C puis 8 ml de milieu sont rajoutés pour permettre l'inactivation de la trypsine. Les cellules sont alors resuspendues par aspiration grâce à une pipette.

800μl de la suspension sont repris dans un nouveau flasque de 75cm² contenant 10 ml de milieu frais, ce qui permet d'avoir une dilution au 1/12. Il faut alors environ 3 jours pour avoir un flasque de nouveau à confluence.

I.2. Les bactéries électrocompétentes

Les deux types de bactéries qui ont été utilisés sont d'une part les bactéries *E.coli* XL1-Blue, et d'autre part, les bactéries *E.coli* Sure. Ces dernières empêchent les recombinaisons d'ADN. Les deux types de bactéries ont été rendues électrocompétentes de la manière suivante :

Les bactéries sont cultivées dans 500 ml de milieu SOB à 37°C, jusqu'à avoir une densité optique de 0,6 à 600 nm. Elles sont alors centrifugées 5 min à 6000 rpm (4°C). Le culot de bactéries est ensuite resuspendu vigoureusement avec de l'eau distillée à 4°C. Cette opération est renouvelée deux autres fois, puis le culot bactérien est resuspendu dans 2 ml de glycérol 10%, qui sont repartis par la suite dans des Eppendorfs stériles à raison de 105 µl par eppendorf. Les bactéries sont alors conservées à -80°C.

II. Les vecteurs et la séparation des fragments d'ADN

II.1 Les plasmides utilisés

Le vecteur pSMART (1800 pb) qui contient le génome entier du PPV, est le clone infectieux qui a été utilisé comme matrice pour créer les mutants. C'est aussi dans ce vecteur que les mutants ont été clonés par échange de fragments.

Un autre vecteur est le vecteur dit intermédiaire, il s'agit de pSMART contenant la région unique, répétée et épinglée à cheveux 5' du génome du PPV.

Le vecteur pFastBacHTB (4857 pb), a servi à la production du mutant W540A en système baculovirus. Ce vecteur contient un Tag Histidine en N-terminal, qui permet la purification des protéines recombinantes.

Enfin, le vecteur pCDNA contient l'ADN de la protéine VP2 dont l'acide aminé W540 est muté en alanine. La VP2 a été clonée dans ce vecteur avec des amorces contenant les sites de restriction BamHI et XbaI.

II.2 La séparation de fragments d'ADN sur gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'agarose 0,8%. Pour cela 0,8 grammes d'agarose est solubilisé dans 100 ml de tampon TAE (40 mM de Tris-acétate pH 8 et 1 mM d'acide éthylène tétra-acétique EDTA). Le tampon de migration est aussi constitué de

TAE. Les échantillons d'ADN sont additionnés de tampons de chargement de migration 6X (0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol FF et 30% de glycérol). La migration des échantillons et d'un marqueur de poids moléculaire se fait à 100V durant une heure.

Après migration, le gel d'ADN est coloré à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/µl), pendant environ 15 minutes, puis, révélé sur un Trans-illuminateur ultraviolet (UV).

III. Clonage des mutants en C-terminal dans le vecteur intermédiaire

III.1. Préparation des mutants

Les mutants de la partie C-terminale de VP2 ont été obtenus par réaction de polymérisation en chaîne PCR (*Figure 10*). La première mutation consiste à ajouter une tyrosine à la partie terminale de VP2 ce qui permet d'allonger cette protéine d'un acide aminé. La seconde mutation consiste à éliminer la leucine qui se trouve avant le dernier acide aminé et ainsi raccourcir VP2 (*Tableau 1*).

La réaction a été réalisée en duplicata pour chacun des mutants par mélange de: 10 µl de tampon spécifique de la polymérase Fusion (5X), 0,5 µl de polymérase à ADN thermostable (Fusion) (10X), 1,25 µl d'amorce antisens de mutagenèse de concentration 20 pmol/µl, (correspondant à l'une ou l'autre des mutations), 1,25 µl d'amorce sens à 20 pmol/µl (qui se trouve dans VP2), 1 µl de dNTP à 10 mM, 5 µl de vecteur (pSMART contenant le génome entier du PPV) à 5 ng/µl et enfin 31 µl d'eau PCR. Le volume réactionnel total est de 50 µl.

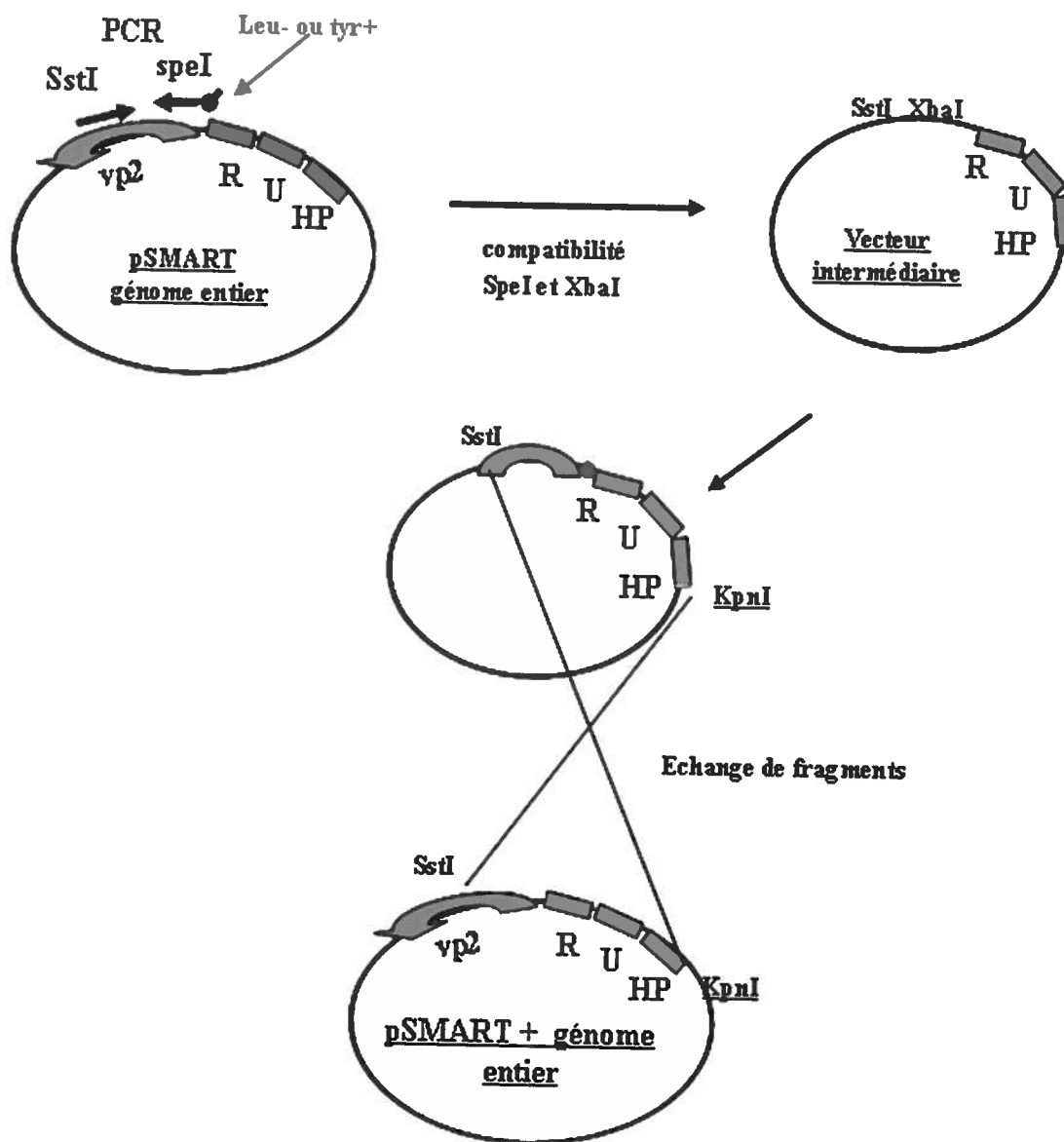
Le programme qui a servi à la mutagenèse utilise comme température d'hybridation (des amorces) le T_m dont l'amorce est le plus bas (ici 51°C). Le premier cycle dure 2 minutes à 94°C. Il est suivi de 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 51°C et 32 s à 72°C et enfin un dernier cycle de 7 min à 72°C. Suite à la réaction d'amplification, 5 µl de chaque réaction sont mis à migrer sur gel d'agarose afin de vérifier si l'amplification a bien été réalisée.

Figure10 : Formation des mutants Leucine- et Tyrosine+ dans le clone infectieux.

Tout d'abord, les mutants ont été créés par mutagenèse grâce à une amorce antisens contenant la mutation désirée, puis le produit de PCR a été cloné dans un vecteur intermédiaire contenant la région unique, répétée et épingle à cheveux.

Ce clonage, grâce à une compatibilité entre les sites de restriction SpeI et XbaI, permet de régénérer la partie terminale située entre VP2 et la région répétée et ceci en plus de la mutation créée.

Ensuite, un échange du fragment (situé entre SacI et KpnI) entre le vecteur intermédiaire et le clone infectieux est réalisé.



<u>Mutation</u>	<u>Séquence de l'amorce de mutagenèse</u>	<u>Orientation</u>
	GTAAATGTGGAAGAGCTCC SacI	Sens
Tyrosine (+)	GTCACTAGTAGTATAATTTCTTGGTATAAG SpeI	Anti-sens
Leucine (-)	GTCACTAGTATTTTCTTGGTATAAGTTG SpeI	Anti-sens

Tableau 1 : Séquences des amorces sens et anti-sens ayant servi à la mutation par PCR de la partie C-terminale de VP2.

Les deux mélanges réactionnels par mutant ont été mélangés, puis précipités en additionnant 2 volumes d'éthanol 100% et 1/5 de volume d'acétate d'ammonium 10 M. La précipitation est effectuée durant environ 3 heures ou toute la nuit à -20°C.

Les deux échantillons sont centrifugés 10 min à 21000g (RCF). Les culots d'ADN sont par la suite lavés avec 500 µl d'éthanol 70%, par centrifugation 2 minutes à 21000g. Puis les culots sont laissés séchés à 37°C jusqu'à évaporation de l'éthanol. L'ADN est ensuite solubilisé dans 20 µl d'eau distillée et déionisée à 37°C durant environ 30 minutes. 2 µl d'ADN pour chaque mutant sont mis à migrer sur gel d'agarose, pour vérifier la concentration approximative de l'ADN des deux solutions.

III.2. Digestion du vecteur intermédiaire et des inserts

10 ug de vecteur intermédiaire à 1 µg/µl, sont digérés dans un volume réactionnel de 20 µl contenant : 2 µl de tampon 4 (NEB) 10X, 0,2 µl de BSA 100X, 2 µl d'enzyme XbaI Invitrogen et 2 µl d'enzyme SacI (NEB). Le tout est complété à 20 µl avec de l'eau distillée déionisée. La digestion est réalisée pendant 3 heures à 37°C, et le produit de digestion est complété à 500 µl avec du TE puis l'ADN est purifié au phénol/chloroforme et précipité à l'éthanol (cf III.6.). L'ADN est resuspendu dans 15 µl d'eau DD.

En ce qui concerne les inserts, 18 µl soit la totalité des inserts mutants resuspendus sont digérés par l'enzyme SacI dans un volume réactionnel total de 25 µl contenant 2 µl d'enzyme SacI (NEB), 2,5 µl de tampon 1 (NEB), 0,25 µl de BSA 100X et 2,25 µl d'eau DD. La digestion est effectuée pendant 3 heures à 37°C. Puis l'enzyme SacI est inactivée à la chaleur 20 minutes à 65°C. Le mélange est précipité à l'éthanol 100% (2 volumes d'éthanol et 1/5 de volume d'acétate d'ammonium 10 M à -20°C pendant 2 heures). Ensuite, l'ADN est resuspendu dans 20 µl d'eau DD, dont 2 sont mis à migrer sur gel d'agarose 0,8%.

18 µl d'ADN resuspendus sont digérés par l'enzyme de restriction SpeI dans un volume total de 25 µl composé de: 3 µl SpeI (NEB), 0,25 µl de BSA, 2,5 µl de tampon 2 (NEB) et 1,25 µl d'eau DD. La digestion dure 2 heures à 37°C puis l'enzyme SpeI est inactivée à la chaleur 20 minutes à 65°C. Le mélange est précipité à l'éthanol 100%, comme précédemment, et resuspendu dans 20 µl d'eau DD.

III.3. Ligation des inserts dans le vecteur intermédiaire

La ligation des inserts mutés dans le vecteur intermédiaire est réalisée dans un volume final de 10 µl, avec un ratio de 1/5 de vecteur par rapport aux inserts. Ceci, en présence de 1 µl de ligase (T4 DNA ligase, NEB) et de 1 µl de tampon de ligation 10X (tampon NEB pour T4 DNA ligase). La ligation est effectuée à la température ambiante durant environ 3 heures.

III.4. Transformation dans les bactéries électrocompétentes

1 µl de produit de ligation est utilisé pour transformer 50 µl de bactéries électrocompétentes. Ceci dans une cuve de 0,1 cm (cuves BTX, 1 mm) avec un voltage de 1,8 KV. La transformation est réalisée à l'aide d'un électroporateur (BTX ECM 395 Electroporator System). Suite à l'électroporation le contenu de la cuve est étalé sur une boîte de LB-agar contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

Les bactéries sont alors cultivées à 30°C durant environ une vingtaine d'heures. Ensuite, 24 colonies sont repiquées dans 2 ml de milieu LB liquide contenant 100 µg/ml d'ampicilline. La culture se fait à 30°C toute la nuit sous agitation (à 200 rpm).

III.5. Extraction d'ADN par minipréparation et vérification des bons clones

1,5 ml de chacune des 24 cultures de 2 ml qui ont poussé toute la nuit, sont centrifugés 1 minute à 14000g, puis, le culot est resuspendu dans 100 µl de solution I (25mM de Tris-HCl, 50 mM de glucose et 10 mM EDTA) par vortex. Ensuite, 200 µl de la solution II (1% SDS et 0,2 N NaOH) sont ajoutés et le tout est mélangé par inversion jusqu'à l'obtention d'un précipité blanc. Le mélange est laissé 5 minutes à la température ambiante pour permettre la lyse des bactéries.

Une fois les bactéries lysées, 200 µl de solution III (5 M d'acétate de potassium et 11% d'acide acétique glacial) est ajouté, ceci permet de neutraliser la lyse des bactéries. Cette neutralisation se fait durant 10 minutes dans la glace. Le mélange est par la suite centrifugé à 15000g pendant 10 minutes, ce qui permet de précipiter les débris cellulaires au fond des tubes et d'avoir l'ADN dans le surnageant.

Ensuite 500 µl de surnageant est repris avec 0,8 volume d'isopropanol (400 µl), et le mélange est réalisé par inversion puis laissé reposer 10 minutes à température ambiante, et centrifugé 5 minutes à 21000g, dans le but de précipiter l'ADN. Chacun des culots est lavé avec 500 µl d'éthanol 70% par centrifugation 2 minutes à 21000g, puis le culot d'ADN est laissé à sécher 30 minutes à 37°C. Le culot d'ADN est alors resuspendu dans 40 µl d'eau DD contenant 10 µg/ml de RNaseA.

5 µl de chacun des clones est mis à migrer sur gel d'agarose afin de différencier les plasmides qui se sont refermés sur eux-mêmes, des plasmides qui contiennent l'insert. 10 µl de mini-préparation de 2 clones qui semblent contenir l'insert, ainsi que 10 µl d'un plasmide qui ne semble pas le contenir sont digérés dans un volume réactionnel total de 15 µl contenant : 0,5 µl d'enzyme XbaI, 1,5 µl de tampon 2 (Invitrogen) et 3 µl d'eau DD. La digestion est effectuée pendant 1 heure à 37°C et les produits de digestion sont séparés sur gel d'agarose.

Les bons clones sont ceux qui ont montré une résistance à l'enzyme XbaI, car ils ont perdu le site de restriction du fait de la compatibilité SpeI et XbaI. Un des clones positifs est remis en culture dans 50 ml de LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline à partir des 0,5 du 2 ml de miniculture restants. La culture est réalisée à 30°C pendant environ 16 heures, puis 1 ml de la culture est repris dans 1 ml de glycérol 50% pour conservation à -80°C. Le reste de la culture est utilisé pour faire une extraction d'ADN par midipréparation et vérification du clone par séquençage.

III.6. Extraction d'ADN par midipréparation et phénol/chloroforme

Les solutions utilisées lors de cette étape sont les mêmes que celles de l'étape précédente de minipréparation d'ADN. La culture de 50 ml est centrifugée durant 5 minutes à 5000rpm et à 4°C, le culot est alors resuspendu dans 4 ml de solution I par vortex, puis, 4 ml de solution II de lyse est ajouté. Le mélange se fait par inversion jusqu'à obtention d'un précipité blanc, la lyse se fait durant 5 minutes à température ambiante, puis 4 ml de solution III de neutralisation est ajouté. La neutralisation se fait dans la glace pendant 10 à 15 minutes.

Le mélange est centrifugé 12 minutes à 10000rpm et à 4°C, le culot contient alors les débris bactériens, alors que le surnageant, contient l'ADN. Au surnageant est ajouté 0,8 volumes d'isopropanol, et le tout est mélangé par inversion jusqu'à ce que la solution devienne trouble. L'ADN est alors précipité par centrifugation 5 minutes à 21000g, puis lavé avec de l'éthanol 70% par centrifugation 3 minutes à 21000g. Le culot d'ADN est repris avec 500 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) contenant 5 µl (RNase 10 mg/ml), à 37°C, pendant environ 30 minutes.

La purification de l'ADN est réalisée par extraction au phénol chloroforme comme suit : 1 volume de phénol pH 8 est ajouté sur le mélange de 500 µl de TE/RNase, puis mélangé par vortex et centrifugé 3 minutes à 14000g. La phase supérieure est alors reprise avec 1/2 volume de phénol et 1/2 volume de chloroforme. Le tout est mélangé par vortex, et recentrifugé 3 minutes à 14000g. La phase supérieure est enfin reprise avec un volume de chloroforme puis mélangée et centrifugée 3 minutes à 14000g.

La phase supérieure issue de cette dernière étape est utilisée pour une précipitation à l'éthanol de l'ADN (voir Préparation des mutants) puis l'ADN est dissout dans 70 µl d'eau DD dont 5 µl sont mis à migrer sur gel d'agarose.

III.7. Purification d'ADN par la trousse Miniprep Express Matrix pour le séquençage

30 µl d'ADN, issus de l'étape précédente, est mélangé à 900 µl de matrice par vortex puis centrifugés 10 secondes à 21000g. Le culot est alors lavé avec 900 µl d'éthanol 80% puis centrifugé 10 secondes à 21000g. Le culot est séché à 37°C et l'élution se fait par ajout de 100 µl d'eau DD et centrifugation 2 minutes à 14000g. 10 µl d'ADN sont utilisés pour le séquençage avec l'amorce sens qui a servi à la mutagenèse.

IV. Clonage des mutants dans le clone infectieux, tranfection et détection de VP2.

IV.1. Digestion du clone infectieux et du clone intermédiaire

Le clone infectieux et les vecteurs intermédiaires (10 µl, 1 µg/µl) sont digérés par les enzymes de restriction SacI et KpnI, dans un volume réactionnel de 20 µl qui contient 0,2 µl de BSA 100X, 2 µl de tampon 1 (NEB) (10X), 2 µl de KpnI (10 U/µl NEB), 2 µl de SacI (10 U/µl) et 3,8 µl d'eau DD. La réaction est effectuée pendant 2 heures et à 37°C, puis, l'ADN est mis à migrer sur gel d'agarose (« Low-Melt », 1%). Ainsi, les bandes correspondant au vecteur (le clone infectieux) et l'insert provenant du clone intermédiaire, sont découpées sur le gel d'agarose et mises dans deux Eppendorfs.

IV.2. Ligation de l'insert dans le clone infectieux et sélection des clones

La ligation est réalisée dans le gel « Low-Melt » comme suit: les deux Eppendorfs contenant les deux bandes d'agar, sont mis dans de l'eau bouillante pendant environ 5 minutes, afin de permettre la fusion de l'agar. Puis, 9 µl des deux agars fondus est mélangé dans un troisième Eppendorf qui est directement mis à 37°C, ce qui empêche la solidification de l'agar. 2 µl de tampon de ligation 10X (tampon NEB pour la T4 DNA ligase) sont ajoutés, puis, à température pièce, 1 µl de ligase est ajouté (T4 DNA ligase, NEB). La ligation est effectuée pendant 2 heures puis l'agar est refondu pendant 1 minute. 2 µl du mélange est utilisé pour transformer 50 µl de bactéries électrocompétentes (cf III.4.). Les colonies qui ont poussé sur agar sont cultivées dans 2 ml de milieu LB et sont utilisées pour une extraction d'ADN par minipréparation (cf III.5.).

L'ADN issu de ces mini-préparations, est purifié par le Kit Miniprep Express Matrix (cf III.7). Les bons clones sont sélectionnés par séquençage avec l'amorce sens qui a servi à la mutagenèse, un clone ayant la mutation est alors séquencé avec les différentes amorces permettant de couvrir les parties correspondant à VP1 et VP2 (*Tableau 2*). Une culture de 50 ml est ensuite lancée pour un bon clone.

<u>Nom de l'amorce</u>	<u>Séquence de l'amorce de mutagenèse</u>
2146F	TTCACCAACAACCTGCACTTAAC
2869F	AGGAAATGAATCTGGGGGTG
3466F	TCCACCAACATACTGGAC
<u>SrVpSacFor</u>	GAGCTCCAAAGCAACAATTTAAT

Tableau 2 : Séquences des amorces qui ont servi au séquençage de VP1 et VP2 après le clonage dans le clone infectieux

IV.3. Extraction et purification d'ADN avec la trousse d'extraction de Qiagen

Ce protocole permet d'avoir un ADN suffisamment pur pour permettre la transfection dans des cellules de mammifère, il se déroule comme le protocole de midipréparation mais avec les solutions I, II et III du Kit et après l'ajout de la solution III, le mélange est centrifugé 30 minutes à 15000g pour obtenir le surnageant contenant l'ADN.

La colonne est équilibrée par ajout de 4 ml de tampon QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% isopropanol et 0,15% de Triton X-100). Le surnageant contenant l'ADN est alors passé sur la colonne. La colonne est ensuite lavée avec 20 ml de tampon QC (1 M de NaCl, 50 mM MOPS pH7 et 15% isopropanol), puis l'ADN est élué avec 5 ml de tampon QF (1,25 M NaCl, 50 mM Tris-Cl, pH 8,5 et 15% isopropanol). L'ADN est par la suite précipité en ajoutant 3,5 ml d'isopropanol et centrifugé 15 minutes à 21000g et le culot est lavé avec 5 ml d'éthanol 70%, séché à 37°C durant environ 30 minutes puis dissout dans 200 µl d'eau DD. L'ADN est par la suite séquencé (*Tableau 2*).

IV.4. Transfection des cellules PT à la lipofectamine

Les cellules PT sont cultivés dans des plaques à 6 puits à 37°C (2 ml/puit, 5% CO₂) jusqu'à confluence des puits. Les puits sont alors rincés avec 2 ml de PBS 1X (Dulbecco's Phosphate buffered saline Gibco BRL), puis 2 ml de milieu DMEM contenant du sérum sont ajoutés aux puits et les cellules sont remises à 37°C.

L'ADN correspondant aux mutants et au clone infectieux est préparé à la transfection comme suit: 4 µg d'ADN est mélangé à 250µl de milieu DMEM ne contenant pas de sérum. De même, 10 µl de lipofectamine est mélangé à 250µl de DMEM sans sérum et laissé reposer 5 minutes à température ambiante. Ensuite 250 µl du mélange ADN-DMEM est ajouté au mélange lipofectamine DMEM et le tout est laissé incubé 20 minutes à température pièce.

500 µl du mélange ADN-lipofectamine est ajouté goutte à goutte aux 2 ml de culture cellulaire, et le tout est laissé 4 heures à 37°C, pour permettre la transfection. Le milieu est ensuite enlevé et les cellules sont lavées avec 2 ml de PBS 1X, puis, mises en présence de 500µl de trypsine pendant environ 5 minutes à 37°C. La trypsine est ensuite

neutralisée par ajout de 4,5 ml de milieu DMEM contenant du sérum. 500 µl du mélange est ajouté dans un puit de plaque de 24 puits contenant une lamelle stérile. Pour chacun des mutants et le clone infectieux, cette dernière étape est réalisée en triplicata et la culture sur les lamelles, effectuée pendant 24 heures, à 37°C.

IV.5. Détection des protéines VP2 par immunofluorescence

Le milieu de culture de 500 µl de l'étape précédente est retiré des plaques à 24 puits, et est remplacé par 200 µl de formaldéhyde 3% (dans tampon d'immunofluorescence (IF) constitué de PBS 1X, 0,1% de Tween 20, 0,1% de BSA et 0,02% NaN₃). La fixation est effectuée pendant 30 minutes à température ambiante puis les lames sont lavées 3 fois avec du PBS 1X. Ensuite, la perméabilisation des cellules se fait en ajoutant 200 µl de Triton X100 3% (dans du tampon IF) pendant 30 minutes à température ambiante, et là encore, les cellules sont lavées 3 fois au PBS 1X. 200 µl d'un mélange d'anticorps primaires sont ajoutés : un anticorps 3C9 anti-capside de souris dilué au 1/50 et un anticorps anti-VP2 de lapin dilué au 1/1000 dans du tampon IF. L'incubation se fait pendant 1 heure à température ambiante, et à l'abri de la lumière. Puis, les lames sont lavées 3 fois au PBS 1X et ceci pendant environ 1 minute, pour permettre de diminuer le bruit de fond.

200 µl d'un mélange d'anticorps secondaires est ajouté: un anticorps anti-lapin marqué à l'Alexa 488, dilué au 1/2000, et un anticorps anti-souris marqué à l'Alexa 568, dilué lui aussi au 1/2000 dans du tampon IF. L'incubation se fait pendant 1 heure à la température ambiante et à l'abri de la lumière, puis les lamelles sont lavées 3 fois au PBS durant environ 1 minute. La coloration des noyaux se fait en ajoutant 200 µl de colorant de Hoechst pendant 30 minutes, puis lavage au PBS 1X trois fois.

Les lamelles circulaires sur lesquelles les cellules ont poussé sont alors séchées sur un mouchoir puis déposées sur les lames de montage, sur laquelle une goutte de milieu de montage est préalablement déposée. Les lamelles circulaires sont alors scellées grâce à du vernis à ongles. Les lames sont conservées à l'abri de la lumière et visualisées par microscopie à fluorescence et confocale (Bio-Radiance 2000) au grossissement 20X et 40X.

V. Production du mutant W540A de VP2 en système baculovirus

V.1. Clonage du mutant W540 dans le vecteur pFastBacHTB

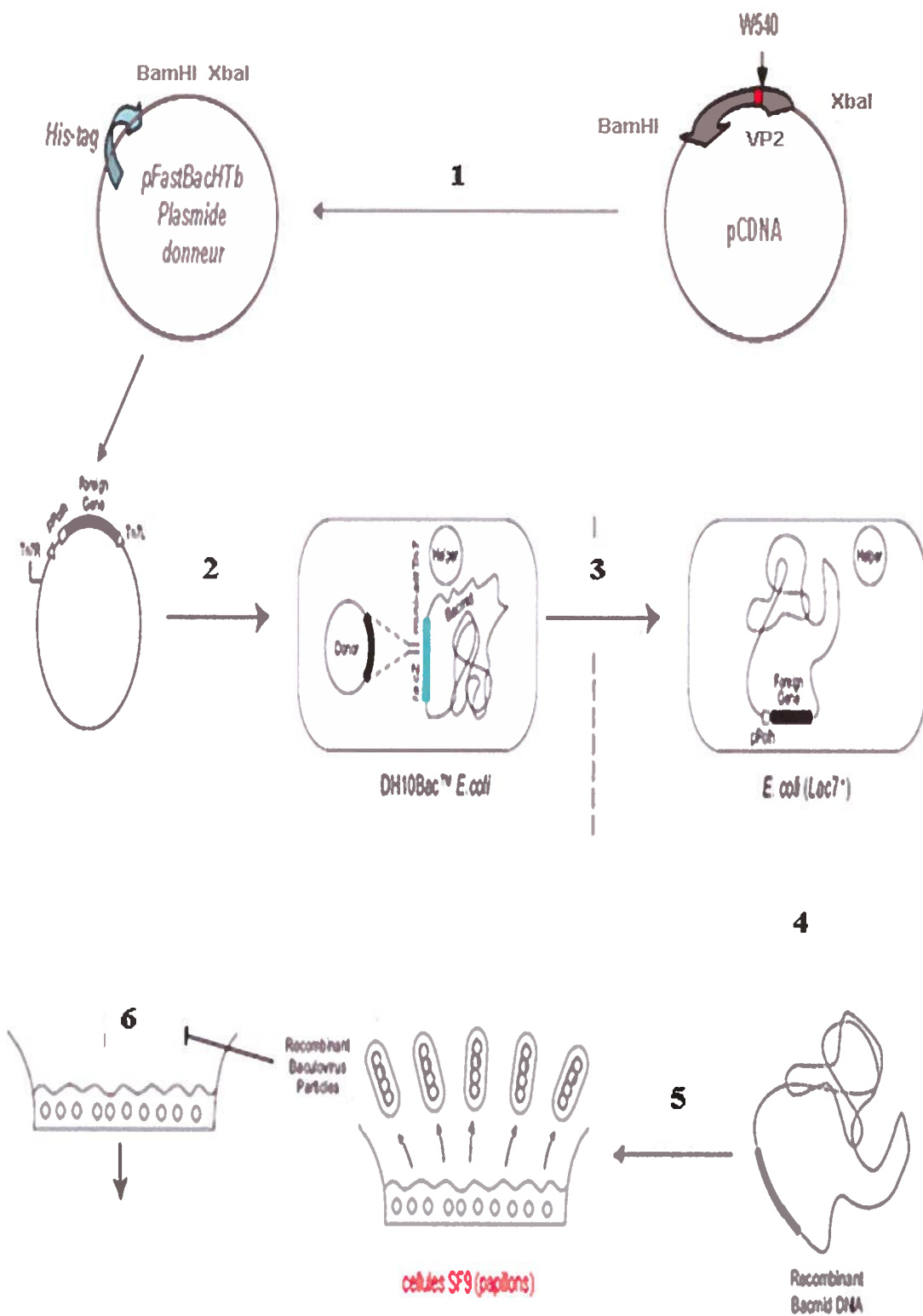
10 µg de vecteur pFastBacHTB et 10 µg de vecteur pCDNA (qui contient l'ADN codant pour le mutant W540A de VP2), sont digérés par l'enzyme de restriction XbaI (*Figure 11*). Le volume total de la réaction est de 25 µl et contient: 2.5 µl de tampon 2 (Invitrogen) (10X) et 2 µl d'enzyme XbaI (Invitrogen). La réaction est réalisée pendant 2 heures à 37°C puis 2 µl du mélange est mis à migrer sur gel d'agarose pour vérifier que la digestion est correcte. Ensuite 0,31 µl de NaCl 4 M et 2 µl d'enzyme BamHI (Invitrogen) sont ajoutés au mélange et la digestion laissée 2 heures à 37°C. Le mélange est ensuite mis à migrer sur gel d'agarose (Low-Melt) et les bandes sont découpées. La ligation est réalisée dans le gel (...) (cf IV.2.). Les colonies sont repiquées pour mini-préparation (cf III.5.). La sélection des bons clones se fait par digestion par les enzymes XbaI et BamHI. Les bons clones sont utilisés pour faire une midi-préparation (cf III.6.)

V.2. Transformation dans les bactéries DH10Bac contenant le bacmide

1µl (100 ng/µl) de vecteur pFastBacHTB (contenant VP2 W540A), a servi à transformer 50 µl de bactéries DH10Bac comme suit: le mélange entre l'ADN et les bactéries est mis sur la glace pendant environ 30 minutes, puis la transformation est effectuée par choc thermique, en mettant le mélange 45 secondes à 42°C. Puis, le mélange est remis dans la glace pendant au moins 2 minutes. 1 ml de milieu SOC est ensuite ajouté au mélange et le tout est mis 4 heures à 37°C sous agitation. 100 µl du mélange est ensuite étalé sur boîte d'agar contenant kanamycine (50 µg/ml), tétracycline (10 µg/ml), ampicilline (10 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) et X-gal (100 µg/ml). L'incubation se fait à 37°C pendant environ 24 heures et les colonies blanches sont sélectionnées et remises en culture dans 2 ml de LB contenant: kanamycine (50 µg/ml), gentamycine (7 µg/ml) et tétracycline (10 µg/ml), et ceci pendant une vingtaine d'heures à 37°C.

Figure 11 : Expression du mutant W540A de VP2 dans les cellules Sf9

- 1- Clonage BamHI, XbaI de la protéine VP2 mutée dans le vecteur pFastBacHTB
- 2- Transformation de pFastBacHTB-VP2 dans les bactéries E.coli DH10Bac contenant le bacmide et un plasmide auxiliaire permettant la transposition.
- 3- Transposition en présence d'antibiotiques UPTG et X-gal
- 4- Sélection des colonies blanches, extraction de bacmides recombinants et PCR pour vérification.
- 5- Transfection en cellules d'insectes
- 6- Infection de cellules d'insectes



V.3. Extraction des bacmides et sélection des recombinants par PCR

L'extraction des bacmides est réalisée par mini-préparation spécifique en utilisant différentes solutions précédemment utilisées (cf III.5.).

1,5 ml de chaque culture est centrifugé 1 minute à 14000g, puis, le culot est resuspendu avec 300 µl de solution I. Cette étape de resuspension est réalisée par inversion (pas de vortex), puis, 300 µl de solution II est ajouté. Le mélange est laissé à température pièce pendant 5 minutes, et 300 µl de solution III sont ajoutés.

Le tout est mélangé par inversion puis laissé agir 10 minutes sur glace. Le mélange est centrifugé 10 minutes à 14000g, le surnageant est ensuite repris avec 800 µl d'isopropanol, puis mélangé par inversion, et laissé reposer 10 minutes dans la glace. Le bacmide est précipité en centrifugeant le mélange 15 minutes à 14000g. Le culot d'ADN est alors lavé en ajoutant 500 µl d'éthanol 70% et centrifugé 5 minutes à 14000g. Le culot d'ADN est cette fois laissé sécher à l'air libre et resuspendu doucement dans 40 µl d'eau DD.

La vérification de la recombinaison est réalisée par PCR avec les amorces M13/pUC par mélange de : 2 µl d'ADN de chacune des mini-preparations, 1,25 µl (10 pmol/µl) de chacune des amorces sens et anti-sens, 5 µl de tampon de l'enzyme Taq polymérase (10X), 1 µl de dNTP 10 mM, 0,5 µl de Taq polymerase et 39 µl d'eau PCR.

Le programme qui permet la PCR, se déroule comme suit: 1 cycle de 3 minutes à 93°C puis 30 cycles de 45 sec à 94°C, 45 sec à 56°C et 5 min à 72°C, puis 1 cycle de 7 minutes à 72°C. 5 µl de produit PCR est déposé sur gel d'agarose pour la sélection des bons clones. Deux bons clones sont cultivés pour extraction de bacmides par midi-préparation (cf III.6. mais sans vortex.).

V.4. Obtention de baculovirus recombinants

V.4.1. Transfection du bacmide dans les cellules Sf9

Une dilution de cellules Sf9 à 1 M de cellules/ml dans du milieu SF900 II SFM (Gibco BRL), contenant, 50 µg/ml pénicilline et streptomycine a été préparée. 2 ml de cette solution ont été utilisés pour ensemercer un puit d'une plaque à 6 puits. Les cellules ont été mises en culture à 27°C, et une fois déposées (au moins 30 min), le milieu a été remplacé par 500 µl de milieu frais.

La préparation du bacmide a été effectuée comme suit : 5 µg d'ADN complétés à 40 µl avec du milieu SF900 II, est mélangé à 10 µl de DOTAP et le tout est laissé reposer 30 minutes. Ensuite 450 µl de milieu SF900 II sont ajoutés. Le mélange DOTAP bacmide est ajouté goutte à goutte aux cellules déposées dans les plaques à 6 puits et le tout est mis à incuber à 22°C durant une nuit. 1 ml de milieu SF900II est ensuite ajouté. L'incubation est poursuivie pendant 5 jours pour permettre la réplication du baculovirus dans les cellules Sf9.

Le tapis cellulaire est alors décollé à l'aide d'un grattoir, et 2 ml du mélange (cellules/ milieu SF900 II) est repartis dans deux Eppendorfs stériles sous hôte laminaire, puis centrifugés 5 minutes à 500g. Le surnageant contient alors le baculovirus.

V.4.2. Première amplification du stock de baculovirus

Les cellules Sf9 sont cette fois diluées à 750.000/ml et 2 ml est utilisé pour ensemercer un puit d'une plaque à 6 puits. Les cellules sont laissées incuber à 22°C pendant au moins une heure, le temps qu'elles se fixent dans les puits. 400 µl de surnageant de baculovirus de l'étape précédente sont utilisés pour infecter les 1,500.000 cellules Sf9. Puis, le mélange est laissé incuber pendant 6 jours à 22°C. Enfin, comme à l'étape précédente, le surnageant de baculovirus est récupéré.

V.4.3. Deuxième amplification du stock de baculovirus

Un flasque de cellules de 75 cm² à confluence est divisé en trois flasques puis est complété comme en culture routinière à 12 ml avec du milieu. Le flasque est ensuite laissé reposer 1 heure à 22°C, le temps que les cellules se fixent. Les cellules sont infectées à

l'aide de 400 µl de surnageant de baculovirus obtenus à l'étape précédente, et là encore, l'infection dure 6 jours. Puis les cellules sont resuspendues à l'aide d'un grattoir et centrifugées comme aux étapes précédentes. Le surnageant contenant le baculovirus est conservé à 4°C tandis que le culot de cellules est utilisé pour vérifier la production de protéines.

V.5. Test des culots de cellules infectées par le baculovirus recombinant

V.5.1. Electrophorèse sur gel SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE est constitué de deux parties :

Une partie inférieure qui est constituée par gel de séparation (de 10%), et qui est préparée en mélangeant 2.5 ml d'eau, 1,5 ml de tampon de séparation 4X pH 8,8 (1,5 M de Tris-HCl et 0,4% SDS), 2 ml d'acrylamide-bisacrylamide 30%, 60 µl de persulfate d'ammonium 10% et 8 µl de TEMED. Le gel est laissé polymériser environ 15 minutes avec de l'eau rajoutée par-dessus.

La partie supérieure qui constitue le gel de concentration (de 5%) est préparée en mélangeant 1,46 ml d'eau, 625 µl de tampon de concentration 4X pH 6,8 (0,5 M de Tris-HCl et 0,4% SDS), 420 µl d'acrylamide 30%, 25 µl d'ammonium persulfate et 8 µl de TEMED. Une fois le gel de séparation polymérisé, l'eau qui a été ajoutée au dessus est enlevée, et le gel de concentration est ajouté par-dessus. Puis, le peigne est immédiatement placé jusqu'à polymérisation du gel.

Les culots de cellules obtenus après infection sont complétés jusqu'à 1 ml avec de l'eau distillée, et 200 µl de tampon d'échantillon 6X (0,063 M Tris-HCl, 10% glycerol, 2% SDS, 5% 2-mercaptoéthanol et 0,05% de bleu de bromophénol) sont ajoutés.

Le tout est bouilli pendant 3 minutes pour dénaturer les protéines, puis centrifugé rapidement. 30 µl par puit d'échantillons sont déposés, de même qu'un marqueur de poids moléculaire. Le gel est ensuite mis dans du tampon de migration (3% Tris-base, 14% glycine et 1% SDS) et est soumis à un courant de 200V pendant 40 minutes.

V.5.2. Transfert sur membrane de nitrocellulose

5 papiers Whatman, et une membrane de nitrocellulose sont découpés selon les proportions du gel, puis sont mis à tremper dans du tampon de transfert (10 mM acide 3-[cyclohexylamino]-1-propansulfonique (CAPS) et 10% méthanol pH 11). Trois papiers Whatman sont placés sur la plaque de transfert puis le gel est placé par-dessus. Ensuite la membrane de nitrocellulose est placée, et enfin, les deux derniers papiers Whatman sont mis par-dessus le tout.

L'appareil de transfert est mis sous tension, et le transfert se fait à 350 mA pendant 60 minutes. Le transfert se fait de la plaque négative vers la plaque positive, les protéines ayant été chargées négativement grâce au SDS.

V.5.3. Révélation de la membrane de nitrocellulose

La première étape consiste à bloquer la membrane avec 15 ml d'une solution de lait 5% dans du TBST (10 mM de Tris, 150 mM NaCl (pH 8), 0,1% Tween pendant une heure. Ceci permet d'éviter que l'anticorps ne se fixe de façon non spécifique à la membrane. Par la suite, 15 ml d'anticorps anti-VP2 de lapin, dilué au 1/1000ème dans du TBST, est ajouté pendant 1 heure. Ensuite la membrane est lavée 3 fois 5 minutes au TBST, puis 15 ml d'anticorps secondaire anti-lapin, dilué au 1/1000ème dans du TBST est ajouté pendant une heure. Cet anticorps est couplé à une phosphatase alcaline. La membrane est ensuite lavée trois fois au TBST, et une fois au TBS (10 mM Tris, 150 mM de NaCl pH 8). La détection de la membrane se fait en trempant celle-ci dans une solution de détection constituée de NBT/BCIP, dilué au 100ème dans du tampon phosphate (100 mM de Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ pH 9,5). Ceci, pendant une quinzaine de minutes à l'obscurité.

V.6. Titration de baculovirus recombinant

Les cellules sont diluées à environ 500.000 cellules /ml et 100 µl sont déposés dans chaque puit d'une plaque à 96 puits. Les cellules sont laissées pendant une demi- heure le temps de dépôt. Le stock de baculovirus (cf V.4.3.) est dilué de 10¹ à 10⁸ fois et en triplicata (100 µl dans 900 µl de milieu de culture) dans des Eppendorfs.

100 µl de chaque dilution sont déposés sur les cellules et l'infection est laissée pendant environ 5 jours. Les cellules sont alors fixées avec 100 µl de formaldéhyde 3% dans du tampon IF pendant 30 minutes (cf IV.5.), lavées une fois avec 300 µl de PBS, puis perméabilisées avec 100 µl de Triton 3% (tampon IF) pendant 30 minutes. Puis elles sont lavées 3 fois au PBS. Ensuite, 100 µl d'anticorps anti-capside de souris dilué au 1/50^{ème}, et 100 µl d'un anticorps anti-VP2 de lapin, dilué au 1/500^{ème}, dans du tampon IF, sont ajoutés et laissés agir pendant environ 2 heures. Les cellules sont rincées 3 fois au PBS puis 100 µl d'anticorps secondaire anti-souris marqué à l'Alexa 488, dilué au 1/2000^{ème}, et 100µl d'anticorps anti-lapin marqué à l'Alexa 568, dilué au 1/1000^{ème} sont ajoutés. Le tout est laissé incubé 2 heures à l'obscurité et à 4°C. Les cellules sont alors lavées au PBS trois fois, et 50 µl de réactif de Hoechst sont ajoutés pendant 30 minutes à l'obscurité. 2 lavages au PBS sont réalisés, et la plus basse dilution ou de la VP2 est produite est alors recherchée.

V.7. Purification de protéines recombinantes

Un flasque de 75 cm² à trois quart confluent a été infecté par le baculovirus recombinant avec une MOI de 1 et l'infection est laissée pendant 96 heures. Ce temps constituait le temps optimal de récolte, avant une trop grande dégradation. Les cellules sont décollées et centrifugées à 1000g pendant 5 minutes, puis les culots cellulaires sont lavés avec 4 ml de PBS, et centrifugés 5 minutes à 1000g.

Le culot cellulaire est lysé avec 4,5 ml de tampon de lyse en conditions natives (50 mM NaH₂PO₄/NaH(PO₄)₂, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8), auxquels sont ajoutés 1% Triton X-100 et 1% Igepal. Le mélange est laissé agir dans la glace, 10 min, puis centrifugé 5 minute à 10000g, le surnageant contenant les protéines est repris dans un tube de 15 ml, et ainsi, est séparé des débris membranaires.

Au surnageant de protéines sont ajoutés 200 µl de billes Ni-NTA, puis le mélange est laissé sous agitation dans la glace pendant 1h30. Le mélange entre les billes et les protéines, est centrifugé 10 min à 1000g puis le surnageant est conservé (il s'agit du « flow-through »). Les billes quant à elles, sont reprises avec 1 ml de tampon de lyse, puis centrifugées pendant 2 minutes à 10000g et le surnageant est conservé.

Les billes sont resuspendues dans 1 ml de tampon de lavage (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}(\text{PO}_4)_2$, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole le tout à pH 8) puis centrifugées 2 minutes à 10000g. Cette étape est réalisée deux fois et les surnageants sont conservés.

Les billes sont resuspendues dans 100 μl de tampon d'élution (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}(\text{PO}_4)_2$, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole pH 8) et le tout est centrifugé 2 minutes à 10000g. Cette étape est répétée 3 autres fois pour permettre l'élution complète de la protéine.

Différents tests ont été effectués, notamment en augmentant la concentration en imidazole du tampon de lavage (50, 100 et 150 mM). Ceci, dans le but de décoller les protéines dont la liaison était non spécifique, et ainsi obtenir notre protéine avec une meilleure pureté.

A 25 μl de chaque surnagent, 5 μl de tampon d'échantillon 6X (cf V.5.1.) sont ajoutés. Les échantillons sont bouillis et rapidement centrifugés. Puis les 30 μl sont déposés sur un gel SDS-PAGE (cf V.5.1.), et la migration se fait à 200 V durant 45 minutes. Deux gels ont été réalisés : l'un fut utilisé pour une coloration au bleu de Coomassie, pour voir l'ensemble des protéines éluées, tandis que l'autre a été utilisé pour effectuer un immunobuvardage de type Western (cf V.5.1.) à l'aide d'un anticorps anti-VP2.

VI. Analyse informatique de la capsid du parvovirus porcin

VI.1. Généralités

VI.1.1. La base de données VIPERdb

Cette base de données se trouve sur le site web (<http://VIPERdb.scripps.edu/>). Il s'agit d'une base de données relationnelle et d'un portail web pour les virus à capsid icosaédrique (Reddy et al., 2001). L'objectif de cette base, est de fournir une ressource complète et spécifique aux besoins de la communauté des virologistes, en mettant l'accent sur la description et la comparaison de données provenant d'analyses structurales et moléculaires de capsides virales.

Le nombre et la qualité des structures actuellement présentes dans la base de données PDB rend l'analyse bioinformatique de ces ensembles réalisable et d'intérêt. L'un des grands avantages de la base de données VIPER a été la mise en place de convention permettant l'orientation des structures des capsides dans l'espace cartésien, en respectant les axes de symétrie icosaédrique. L'adoption d'une seule orientation et convention a permis d'avoir un jeu de matrices standard, unique, permettant la génération de structures de capsides partielles ou complètes, à partir des structures asymétriques provenant de la base de données PDB. De plus, ce standard permet de faciliter les analyses demandant la comparaison parmi différentes structures de capsides (Shepherd et al., 2006), (Carrillo-Tripp et al., 2009).

La base de données VIPER permet aussi, grâce à cette standardisation des fichiers, de fournir plusieurs outils tels une table de contact, qui permet de savoir quels acides aminés sont en contact entre eux, et ceci en fonction de l'axe de symétrie auxquels ils appartiennent (*figure 12*). Une autre fonctionnalité fournie par ce site, est la génération d'oligomères, c'est-à-dire un programme qui va générer des fichiers contenant les matrices correspondant aux protéines de la capsid que l'utilisateur désire sauvegarder.

VI.1.2. Le logiciel de modélisation moléculaire PyMOL

PyMOL est un logiciel de visualisation moléculaire associé à un interpréteur Python. Ce logiciel permet la visualisation en temps réel, ainsi que la génération rapide d'animations et d'images d'assemblages moléculaires de grande qualité. D'après son auteur, pratiquement le quart de toutes les images en 3D de structures protéiques, publiées dans la littérature, l'ont été en utilisant ce logiciel.

Il est par exemple possible d'utiliser PyMOL avec un menu qui est situé en haut à droite d'une fenêtre graphique (« GUI interne »), en plus d'un « GUI externe » (permettant copy/paste), ou encore avec la ligne de commande du logiciel située en bas de la fenêtre. Dans ce cas les commandes tapées sont de la forme : select, color, show cartoon, hide everything (...), etc.

Dans cette étude nous avons privilégié surtout l'utilisation de la ligne de commandes. En effet, certaines fonctions ne se trouvent pas dans le menu graphique, comme par exemple les fonctions de rotation et de translation des molécules.

VI.1.3. La base de données CASTp

Cette base de données se trouve sur le site web (<http://cast.engr.uic.edu>). Elle a été créée suite à l'observation relative au fait, que les cavités situées à la surface des protéines, de même que le positionnement spécifique des acides aminés à l'intérieur de celles-ci, créaient les propriétés physicochimiques nécessaires à la fonction de ces protéines.

CASTp est un outil en ligne, qui permet de localiser et de mesurer la taille de poches protéiques, ainsi que de les visualiser sur la structure 3D des protéines. Le programme prend en entrée l'identifiant PDB (1k3V dans notre cas de PPV) de la protéine que l'on désire étudier. (Dundas et al, 2006). Ce système a déjà été utilisé pour d'autres parvovirus, tels que le MVM et le CPV (Carreira et Mateu, 2006), où des mutations au niveau de cavités ont été réalisées.

VI.2. Analyse et visualisation du contact entre les trimères.

Le contact entre les trimères au niveau de l'axe de symétrie 2 se fait (cf table contacts du PPV) entre les molécules 1 et 6 qui sont contenues dans les trimères constitués des molécules 5, 17, 6 et 1, 7, 9 (*Figure 12*). La table de contact du PPV donne les acides aminés qui interviennent dans cette liaison. Il suffit alors de les sélectionner et de leur attribuer une couleur particulière. Cependant, à cette étape, les trimères étant encore liés, il est impossible de voir le contact, même coloré. Il faut alors déplacer, « traduire » le trimère 1,7, 9 de plusieurs Å selon l'axe des abscisses pour voir le contact entre les trimères.

VI.2.1. Génération d'oligomères et création de modèles

Dans la pratique, la première étape consistait donc à générer les oligomères 5, 17, 6, 1, 7, 9 grâce au générateur d'oligomères de la VIPERdb (ce qui donne un fichier nommé **out_un chiffre.pdb**). Ce fichier a été renommé en **trimeres.pdb** pour les étapes suivantes.

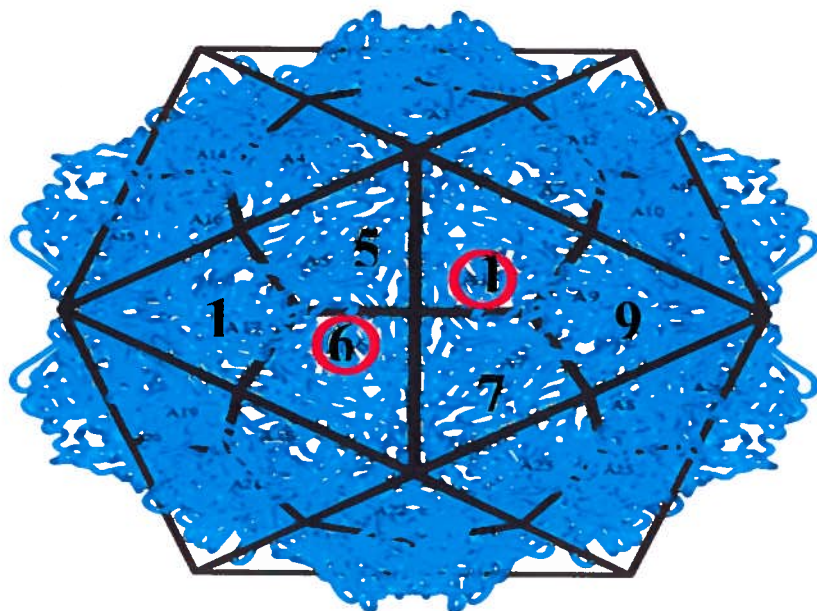
Les fichiers générés par le générateur ne permettaient cependant pas une utilisation optimale sous PyMOL. En effet, pour pouvoir manipuler les protéines 1 et 6 séparément, il fallait qu'elles aient des noms de chaînes différents, ou qu'elles appartenassent à des modèles différents. Or, les fichiers issus du générateur, donnaient à toutes les protéines le même nom de chaîne c'est-à-dire « A » (A1, A6 ...) et il n'y avait pas de modèles séparés dans ces fichiers.

Il fallait donc modifier le fichier « **trimeres.pdb** » en l'ouvrant auparavant à l'aide d'un éditeur de texte puissant, tel que ConTEXT, situé à l'adresse suivante: (<http://www.01net.com/telecharger/windows/Programmation/creation/fiches/30862.html>).

Puis il fallait ajouter au début de chaque matrice (coordonnées d'une protéine) le mot MODEL suivi d'un chiffre quelconque (« find/replace »). Puis à la fin de chaque matrice il fallait remplacer le mot TER par le mot ENDMDL, qui signifiait fin du modèle (« end model »). Ainsi chaque protéine serait considérée comme un modèle différent et pourrait ainsi être manipulée séparément sous PyMOL.

Figure 12 : Acides aminés du contact entre les trimères

Sélection des acides aminés (par leur ordre dans la protéine VP2) qui interviennent dans la symétrie d'ordre 2 c'est-à-dire dans le contact entre les trimères et plus précisément dans le contact entre la protéine 1 et la protéine 6. Les 83 contacts uniques de ces acides aminés ont été obtenus par recherche dans la table de contact de la base de données VIPER.



Molécule	A1	A6
Résidus	50	54
	52	58
	54	132
	122	384
	123	386
	124	534
	125	535
	127	537
	128	539
	131	540
	132	542
	198	543
	199	545
	200	546
	296	547
	299	548
	300	553
	301	556
	534	559
	540	560
	542	561
	545	564
	547	566
		569

Après avoir ouvert le fichier « **trimeres.pdb** » sous PyMOL, il était nécessaire d'écrire les commandes suivantes « **split_states all** », « **zoom** » et « **delete trimeres** » (toujours suivis par « **enter** » pour exécuter les commandes) ce qui permettait de visualiser les deux trimères assemblés. De plus, les modèles apparaissent dans le menu en haut à droite comme suit : all_0001, all_0002 (...) all_0006 : all_0001 correspondait au premier modèle du fichier PDB, c'est-à-dire au monomère 1, all_0002 au monomère 5, et ainsi de suite. En effet, les monomères sont automatiquement classés par ordre croissant dans le fichier PDB lors de la génération de l'oligomère.

VI.2.2. Sélection et coloration des acides aminés

Maintenant que chaque monomère était manipulable séparément, les acides aminés qui sont en contact dans les modèles all_0001 et all_0003 (protéines 1 et 6 cf *Figure 12*) ont été sélectionnés par les commandes suivantes :

```
select un, /all_0001//A/50+52+54+122+123+124+125 ...
```

```
select six, /all_0003//A/54+58+132+384+386+534+535 ...
```

- « **select** » signifie sélection
- Les mots « **un** » et « **six** » sont les noms des sélections (choisis arbitrairement).
- « **/all_0001** » est le modèle contenant les acides aminés qui seront sélectionnés.
- « **//A** » est la chaîne du modèle.
- « **50+52+54+122 ...** » il s'agit de la liste des résidus sélectionnés (*Figure 12*).

Les deux commandes précédentes permettaient de créer les sélections des acides aminés appelées « **un** » et « **six** », ces sélections apparaissent dans la fenêtre de PyMOL,

Il était maintenant possible de manipuler les acides aminés grâce à ces sélections comme suit :

```
color grey
```

```
color orange, un
```

```
color yellow, six
```

Ces commandes permettaient, de colorier en gris toutes les protéines puis, en orange la sélection « **un** » et la sélection « **deux** » en jaune.

VI.2.3. Séparation des deux trimères et visualisation du contact

Les deux trimères sont encore liés à cette étape, il était donc impossible de voir le contact. Il fallait alors sélectionner un des trimères et le séparer grâce aux commandes de sélection :

```
select trimere1, all_0001 + all_0004 + all_0005
```

```
select trimere2, all_0002 + all_0003 + all_0006
```

A la suite de ces commandes, nous avons eu deux sélections appelées l'une trimere1 et l'autre trimere2, qui permettaient de manipuler les trimères de manière indépendante. Cependant, pour pouvoir les séparer il est nécessaire d'utiliser la commande « translate » de PyMOL qui prenait en entrée des objets. Il fallait donc convertir les sélections de trimères en objets et effacer les sélections :

```
create trim1, trimere1
```

```
create trim2, trimere2
```

Ces commandes créent des objets nommés arbitrairement trim1 et trim2 à partir des sélections trimere1 et trimere2.

```
hide everything, trimere1
```

```
hide everything, trimere2
```

```
zoom
```

Ces commandes permettaient d'effacer les sélections de l'écran, pour ne voir que les objets créés à partir des sélections, et non les sélections elles-mêmes.

Il était alors possible de séparer les deux trimères grâce à la commande translate en déplaçant le trimère objet créé à l'étape précédente, de par exemple, 100 Å selon l'axe des abscisses:

```
Translate [100, 0, 0], object=trim1
```

- « Translate » signifie déplacer, et les coordonnées de déplacement se trouvent entre crochets [x,y,z].

- [100,0,0] signifie donc déplacement vers la droite de 100 Å, d'une distance de 0 vers le haut et enfin d'une distance de 0 en profondeur.

La dernière étape consiste à visualiser les deux trimères en surface, en cartoon ou autre, pour cela il faut d'abord les cacher :

hide everything, trim1

show surface, trim1

hide everything, trim2

show surface, trim2

NOTE : il serait aussi possible de “translator” directement les 3 sous-unités sans créer d'objets

NOTE: la translation doit être la dernière étape

VI.3. Analyse des contacts intra-trimères

Cette analyse revenait à étudier le contact entre les molécules 1 et 7 selon les conventions de la VIPERdb (*figure 12*). D'abord l'oligomère (1, 7) constituant un dimère a été généré à l'aide du générateur d'oligomères de la VIPERdb, puis le fichier a été traité comme précédemment décrit (cf VI.2.1.). Les acides aminés en contact ont été recherchés dans la table de contact de la VIPERdb, puis sélectionnés sur les molécules 1 et 7. Les acides aminés sélectionnés de la molécule 1 ont été coloré en jaune et ceux de la molécule 7 en vert. Des objets ont été créés à l'aide de la commande create et les deux protéines ont été séparées de 100 Å mais cette fois selon l'axe des ordonnées à l'aide de la commande « translate » (cf VI.2.2. et VI.2.3.).

VI.4. Structure secondaire en « cartoons » des programmes de visualisation moléculaire

Les programmes de visualisation moléculaire, tels que Cn3D (NCBI) et PyMOL, ont généralement de la difficulté à montrer correctement les structures secondaires (β -strands, α -hélices). Ces structures peuvent être corrigées dans les modèles en cartoon. Les structures réelles peuvent être retrouvées dans les publications originales (PPV: Simpson et al., 2002).

	Structures	
	Réelles	PyMOL
BetaA	49-55	50-55
BetaB	59-72	58-72
Betax1	81-85	81-84
Betax2	102-106	102-106
BetaC	110-112	110-112
BetaD	134-150	134-142,144-146,149-156, 162-166
BetaE	173-177	173-177
Betax3	206-218	209-211
Betax4	232-240	-
BetaF	253-256	254-256
BetaG	262-268	-
BetaH	494-497	494-497
BetaI	518-533	518-533
AlphaA	117-132	117-120,124-131
Alpha B	247-250	247-250

Voici un exemple de solutions pour corriger ce problème :

Par exemple B-strand G (262-268) n'est pas visible sous PyMOL.

Ouvrir le fichier PDB (1k3V) sous PyMOL

```
select selection, resi 262-268
```

```
hide everything, selection
```

```
alter selection, ss='S'
```

```
hide everything,selection
```

```
show cartoon,selection
```

(S strand

H helix

L random coil)

RÉSULTATS

I. Utilisation du couple PyMOL, base de données VIPER.

En utilisant PyMOL avec les données provenant de la base de données VIPER, nous espérons profiter de l'avantage indéniable qu'amenaient chacune des deux technologies pour l'étude de l'assemblage de la capside du parvovirus porcine et des parvovirus en générale, notamment en analysant les contacts protéine-protéine dans la capside.

De plus nous espérons apporter une meilleure compréhension de ces deux ressources à la communauté entière des virologistes travaillant notamment sur les structures icosaédriques de virus.

En effet l'utilisation de la base de données VIPER est d'un grand intérêt car elle fournit une ressource complète pour la communauté des virologistes dans le monde entier. La mise en place de conventions permettant l'orientation des structures de capsides dans l'espace cartésien en respectant les axes de symétrie icosaédriques a été un point important de cette base de données. Cette standardisation a permis la mise au point d'outils permettant la comparaison de structures de capsides avec par exemple un générateur d'oligomères (...).

De plus le logiciel PyMOL est un puissant logiciel de visualisation moléculaire associé à un interpréteur Python. Non seulement la qualité des images fournies par ce logiciel est impressionnante, mais en plus il comporte un éventail très important de fonctionnalités tels que les fonctions de translation, de rotation, de sélection d'atomes, de coloration (...).

Ce logiciel pouvait donc nous permettre une étude approfondie de la structure des capsides de parvovirus, il suffisait pour cela simplement de comprendre et d'apprendre les bases du langage de script utilisé pour le logiciel.

Un problème est très tôt apparu, il s'agit du fait que les fichiers comportant les coordonnées structurales issues de la base de données VIPER ne permettaient pas une utilisation optimale sous PyMOL, en clair il était impossible de manipuler séparément chacun des monomères dans la structure, ce qui est sensé être possible grâce à la

commande 'split_states' de PyMOL. Or, cela était indispensable si l'on voulait profiter du couple PyMOL, VIPER.

Il fallait donc analyser les fichiers issus de la base de données VIPER (Issus du générateur d'oligomères) pour comprendre et voir si l'on pouvait corriger ce problème, et pour cela les ouvrir à l'aide d'un éditeur de texte. Un autre problème est alors apparu, il s'agit du fait que les éditeurs de texte classiques que l'on retrouve sous Windows par exemple ne permettent pas d'ouvrir les gros fichiers tels que ceux contenant les coordonnées de nombreux oligomères, nous avons alors décidé d'utiliser un éditeur de texte puissant et gratuit appelé ConTEXT (utilisé en général par des programmeurs informatique).

Les fichiers de structures sont constitués de matrices c'est-à-dire de coordonnées de protéines VP2, et la commande 'Split_states' de PyMOL permet de traiter séparément ces protéines, ainsi pour expliquer de manière imagée, PyMOL se comporte comme un lecteur qui parcourt les fichiers de structures à la recherche de tag de début et de fin de Matrices, Ces tag sont 'MODEL' et 'ENDMDL' (début de protéine et fin de protéine, modèle ou matrice) pour permettre de manipuler séparément ces protéines.

Or l'analyse des fichiers issus du générateur d'oligomère montre clairement que ces TAG sont inexistant dans ces fichiers, l'idée fut donc de les rajouter aux fichiers et de tester la commande 'Split_states' sous PyMOL le résultat fut celui attendu, il était donc désormais possible de manipuler séparément les protéines sous PyMOL.

Un autre problème est ensuite apparu pour la visualisation en cartoon des protéines, c'est-à-dire des structures secondaires, mais ce problème n'est pas spécifique à PyMOL en effet on peut le retrouver dans des programmes tels que Cn3D (NCBI)...

Une solution existe sous PyMOL pour résoudre ce problème, il suffit d'utiliser la commande 'alter' (détail dans méthodologie VI.4.).

En conclusion le résultat du travail fut concluant puisque nous pouvions désormais utiliser les fichiers issus de la VIPER sous PyMOL et donc profiter pleinement des avantages de standards mis en place par cette base de données pour étudier la structure et

l'assemblage de la capside du PPV et comparer ceux-ci aux autres parvovirus dont la structure est connue, et ceci tout en profitant des outils fournis par PyMOL.

II. Visualisation et analyse du contact inter-trimères au niveau de l'axe de symétrie 2

D'après le modèle hypothétique d'assemblage de la capside des parvovirus émis par Lombardo et al. (Lombardo et al., 2000), les trimères seraient l'intermédiaire d'assemblage de la capside, de plus l'assemblage entre les trimères serait une étape tardive (nucléaire) de la morphogenèse. Ceci nous amène à penser que le contact entre les trimères pourrait faire intervenir des éléments structuraux caractéristiques conservés au cours de l'évolution des parvovirus, et rend donc la visualisation et l'analyse de ce contact inter-trimère d'un grand intérêt.

Les trimères sont liés au niveau des axes de symétrie 2 et 5. Cependant, l'axe de symétrie 5 est aussi celui qui lie les pentamères. L'axe de symétrie 2 est par conséquent le plus spécifique à la liaison entre les trimères

L'axe de symétrie 2, au niveau duquel se trouve une structure caractéristique à la surface de la capside (la fossette), constitue aussi une partie importante du contact entre les trimères. Cette zone de contact est plus faible en terme de nombre d'acides aminés, du fait qu'elle constitue justement une dépression. L'étude de cette partie et son importance dans le contact entre les trimères pourrait apporter une meilleure compréhension des phénomènes de morphogenèse de la capside virale.

Deux trimères ont été générés à l'aide du générateur d'oligomères de la VIPERdb (molécules 1, 7, 9 et 5, 6, 17). Le fichier contenant l'oligomère a été modifié pour permettre le traitement sous PyMOL, puis les acides aminés correspondant à l'axe de symétrie 2 de chacun des trimères, ont été sélectionnés à l'aide de la table de contact de la VIPERdb.

Une représentation en cartoon et la séparation des deux trimères (*Figure 13A*) permettait de voir que la liaison fait intervenir une hélice alpha sur un trimère et une boucle sur l'autre. Les hélices alpha sont généralement associées à une certaine hydrophobie. La

représentation en surface faisait apparaître sur l'un des trimères ce qui correspondrait à deux poches, sur l'autre trimère les chaînes latérales de deux acides aminés qui se trouvent sur la boucle (en cartoon), sembleraient occuper les deux poches : il s'agit du tryptophane 540 et de la proline 542.

II.1 Vérification de la présence de poches à l'aide du programme CASTp

Les deux poches précédemment visualisées n'ont jamais été mentionnées ni décrites dans la littérature, le programme CASTp permettait la recherche de poches à la surface de protéines. Ainsi en soumettant en entrée du programme l'identifiant PDB (1k3V), correspondant à la protéine VP2, nous avons pu localiser la plus grande des deux poches. Celle-ci est constituée de 20 acides aminés, repartis sur des régions distinctes de la protéine VP2, démontrant un repliement complexe de la protéine dans cette zone. Le volume de la poche est de $262\text{\AA}^3$ et les atomes des différents acides aminés intervenant dans sa constitution ont pu être listés. Les acides aminés la constituant sont hétérogènes, c'est-à-dire polaires ou apolaires. Une représentation en surface de la poche connaissant désormais sa séquence a pu être réalisée sous PyMOL (*Figure 13BC*). Le programme CASTp n'a cependant pas permis de retrouver ce qui correspondrait à la seconde poche, en raison possiblement de sa plus grande complexité.

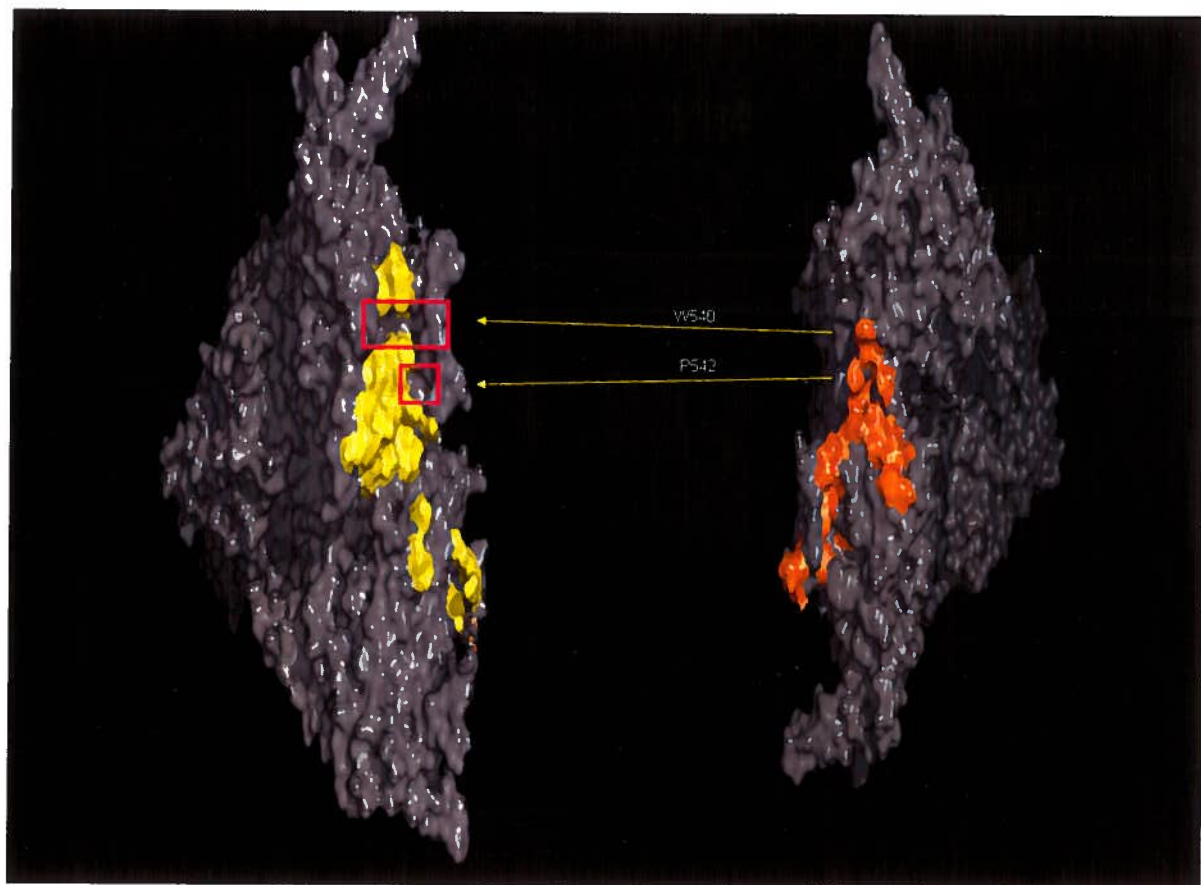
Pour vérifier la liaison du tryptophane 540 à la poche, les acides aminés en contact avec ce dernier ont été recherchés dans les tables de contact de la VIPERdb et il a ainsi pu être montré que ce tryptophane entrainait en contact avec 7 acides aminés de la poche. La taille de la poche est par conséquent plus importante que la taille de la chaîne latérale du tryptophane. De plus, le contact fait surtout intervenir des acides aminés hydrophobes (*Figure 14A*).

Une reconstruction de la poche à proline a quant à elle pu être réalisée à l'aide de la table de contact de la VIPERdb. Cependant, la liaison avec la proline est plus complexe, car elle fait intervenir des acides aminés de nature très différente, mais dans tous les cas l'environnement doit être plutôt favorable, notamment avec la présence des acides aminés hydrophobes que sont la proline 123 et l'alanine 124 ainsi que des liaisons hydrogène faisant intervenir la glutamine 127. La proline semble parfaitement accommodée dans cette poche (*Figure 14B*). Une reconstitution générale du contact a été réalisée (*Figure 14CD*).

Figure 13 : Présence de poches à la surface de VP2 à l'interface des trimères

- (A) Visualisation en cartoon (haut) de deux trimères vus de l'intérieur de la capsid et séparés de 30 Å. Les acides aminés en contact avec les molécules 1 et 6 selon les conventions de la VIPERdb ont été sélectionnés puis coloriés en jaune (molécule 1) et orange (molécule 6). Une représentation en surface a été réalisée (bas).
- (B) Le programme CASTp permet de mettre en évidence et de confirmer la présence d'une poche à la surface du monomère de VP2 à partir de la structure cristallographique de celle-ci (PDB ID 1k3v). Les 20 acides aminés intervenant dans la constitution de cette poche sont surlignés en mauve sur la séquence primaire en acides aminés de VP2.
- (C) 1- Le tableau représente la position des acides aminés sur la chaîne VP2 qui interviennent dans la constitution de la poche (colonne gauche), et plus spécifiquement les atomes des acides aminés en question (colonne centre). Enfin, un symbole de trois lettres représentant le nom de l'acide aminé se trouve dans la colonne de droite. En dessous du tableau, le chiffre 84 représente l'identifiant CASTp de la poche et permet ainsi de la retrouver parmi les autres poches.
- 2- Représentation sous CASTp (Jmol) en cartoon de la structure de la protéine VP2. Les atomes constituant la poche sont représentés en boules mauves sur la structure. Le volume de la poche est de 262 Å³.
- 3- Représentation sous PyMOL en cartoon de la structure de VP2. Les acides aminés de la poche ont été sélectionnés puis colorés en mauve et enfin une représentation en surface de ces derniers a été réalisée.

A



B

Chain A

```

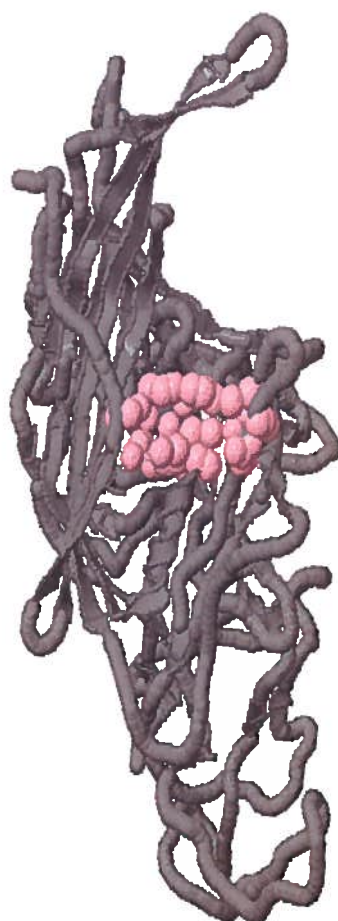
38-  G V G V S T G T F N  N Q T E F Q Y L G E  G L V R I T A H A S  R L I H L N M P E H  E T Y K R I H V L N
88-  S E S G V A G Q M V  Q D D A H T Q M V T  P W S L I D A N A W  G V W F N P A D W Q  L I S N N M T E I N
138- L V S F E Q E I F N  V V L K T I T E S A  T S P P T K I Y N N  D L T A S L M V A L  D T N N T L P Y T P
188- A A P R S E T L G F  Y P W L P T K P T Q  Y R Y Y L S C I R N  L N P P T Y T G Q S  Q Q I T D S I Q T G
238- L H S D I M F Y T I  E N A V P I H L L R  T G D E F S T G I Y  H F D T K P L K L T  H S W Q T N R S L G
288- L P P K L L T E P T  T E G D Q H P G T L  P A A N T R K G Y H  Q T I N N S Y T E A  T A I R P A Q V G Y
338- N T P Y M N F E Y S  N G G P F L T P I V  P T A D T Q Y N D D  E P N G A I R F T M  D Y Q H G H L T T S
388- S Q E L E R Y T F N  P Q S K C G R A P K  Q Q F N Q Q A P L N  L E N T N N G T L L  P S D P I G G K S N
438- M H F M N T L N T Y  G P L T A L N N T A  P V F P N G Q I W D  K E L D T D L K P R  L H V T A P F V C K
488- N N P P G Q L F V K  I A P N L T D D F N  A D S P Q Q P R I I  T Y S N F W W K G T  L T F T A K M R S S
538- N M W N P I Q Q H T  T T A E N I G N Y I  P T N I G G I R M F  P E Y S Q L I P R K  L Y

```

C

48	O	ASN
48	OD1	ASN
50	OG1	THR
65	O	HIS
68	NH2	ARG
118	O	GLY
119	O	VAL
120	C	TRP
120	O	TRP
121	C	PHE
121	CA	PHE
121	O	PHE
122	CA	ASN
122	CB	ASN
122	N	ASN
122	ND2	ASN
123	CD	PRO
123	CG	PRO
197	O	PHE
198	CD1	TYR
198	CE1	TYR
199	CD	PRO
199	CG	PRO
200	CH2	TRP
200	CZ3	TRP
555	O	ASN
556	C	TYR
556	CA	TYR
556	O	TYR
557	C	ILE
557	N	ILE
557	O	ILE
564	CA	ILE
564	CG2	ILE
565	CG	ARG
565	N	ARG
565	O	ARG
566	CE	MET
566	CG	MET

ID = 84



Vol : 262 Å³

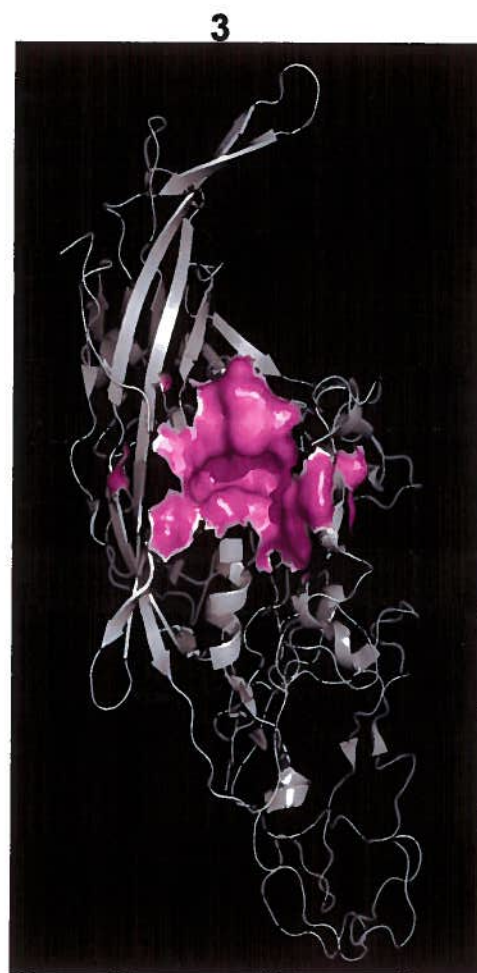


Figure 14 : Contacts entre les poches et les acides aminés conservés entre les trimères

- (A)** Les acides aminés entrant en contact avec l'acide aminé W540 ont été obtenus à partir de la base de données VIPERdb. La nature du contact figure dans la 2^{ème} colonne et la symétrie du contact dans la 3^{ème} colonne.

Les acides aminés qui sont en contact avec W540 et qui sont aussi présents dans la constitution de la poche, sont écrits en rouge et sont représentés en jaune à la surface de la poche. Seul 7 acides aminés sur les 20 de la poche, entrent dans le contact. De plus, le contact avec le tryptophane est majoritairement hydrophobe.

- (B)** Le programme CASTp n'a pas permis de mettre en évidence la présence de la poche dans laquelle serait contenue la proline 542. Cependant, grâce à la table de contact de la VIPERdb, il a été possible de reconstruire une poche potentielle. La surface de cette poche a été représentée à droite.

- (C)** Les acides aminés W540 et P542 sont respectivement représentés dans les deux poches précédemment décrites. Les deux acides aminés sont situés sur la même boucle (colorée en vert) à gauche une représentation en bâton et à droite une représentation en boules des deux acides aminés a été réalisée.

- (D)** Vue intérieur du contact entre deux trimères. Au total, le contact ferait intervenir quatre poches: deux poches à prolines et deux des poches à tryptophanes. Rappelons que le tryptophane et la proline impliqués, sont conservés dans toute la famille Parvovirinae.

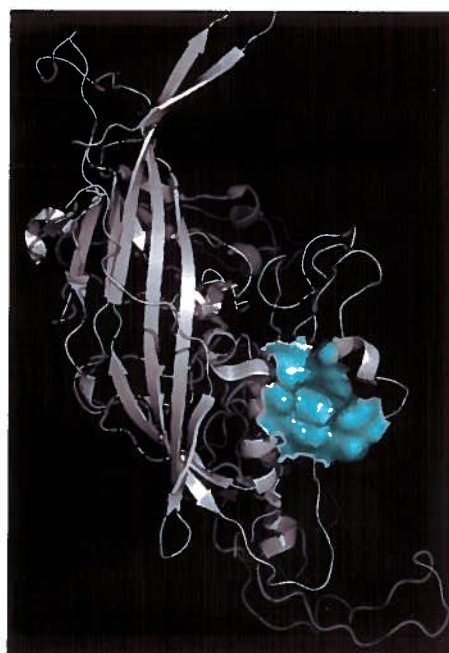
A

ASN122-TRP540	P-H	A1-A6
PRO123-TRP540	H-H	A1-A6
ALA124-TRP540	H-H	A1-A6
TYR198-TRP540	P-H	A1-A6
PRO199-TRP540	H-H	A1-A6
TRP200-TRP540	H-H	A1-A6
ILE564-TRP540	H-H	A6-A1
MET566-TRP540	H-H	A6-A1

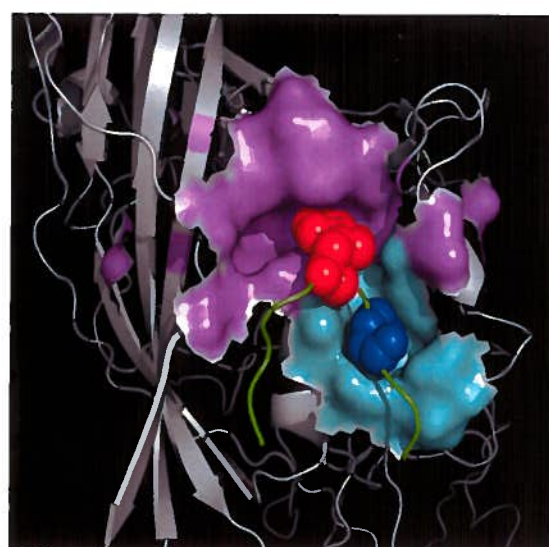
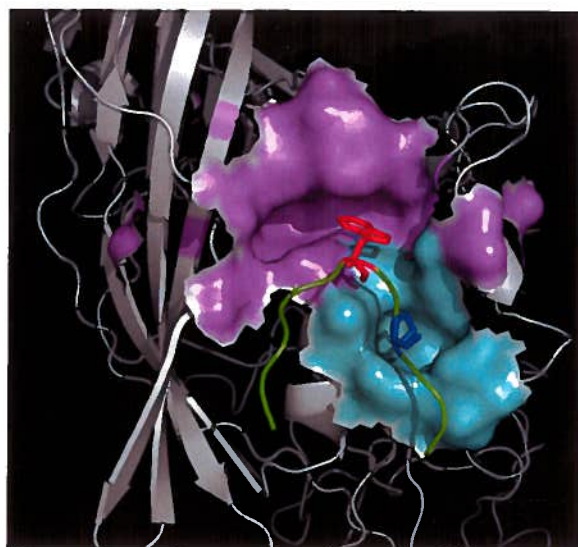


B

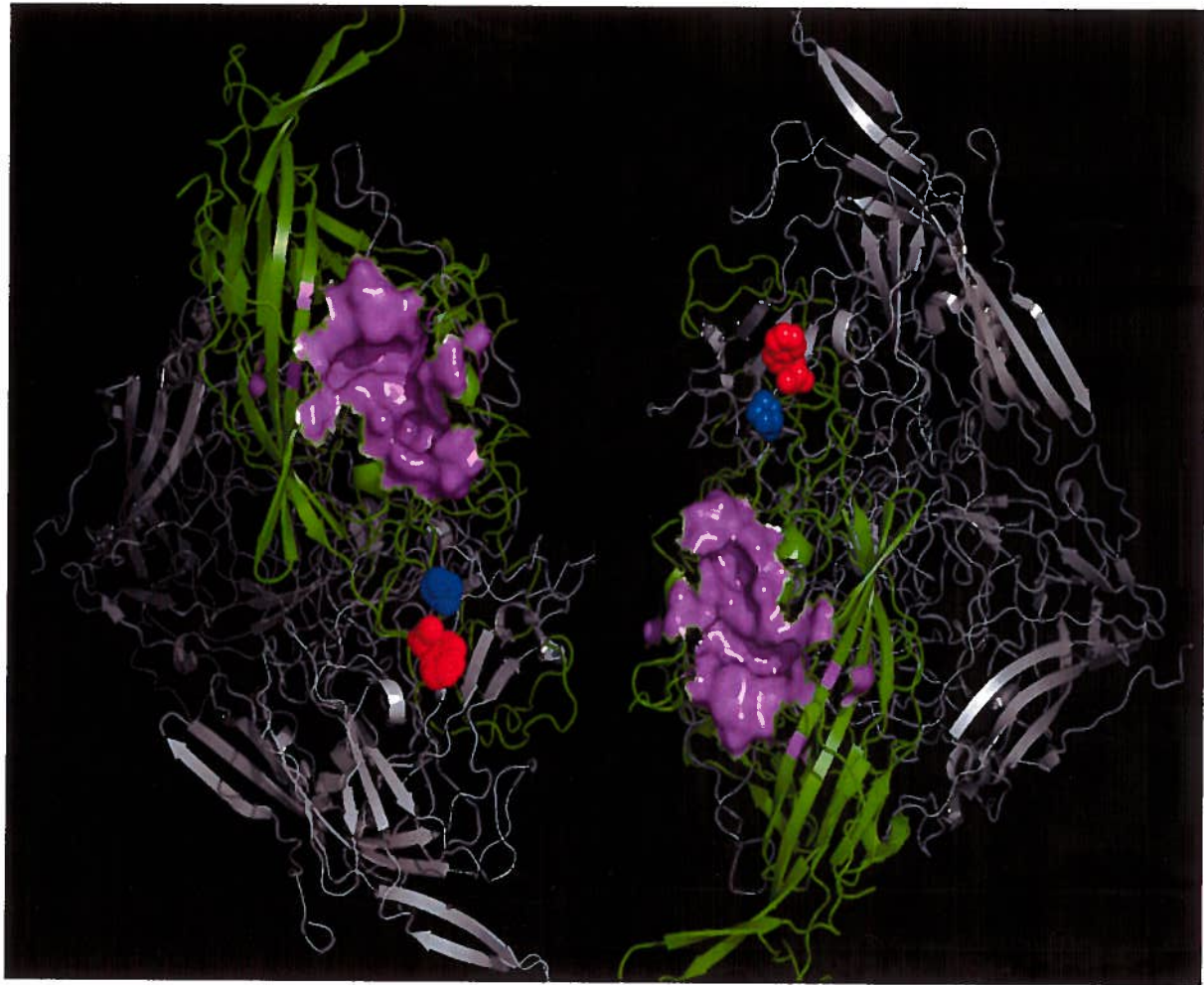
PRO542-PRO123	H-H	A6-A1
PRO542-ALA124	H-H	A6-A1
PRO542-GLN127	H-P	A6-A1
PRO542-HSD546	H-B	A1-A6
PRO542-THR548	H-P	A1-A6
PRO542-TYR556	H-P	A1-A6
PRO542-GLU569	H-A	A1-A6
THR547		



C



D



Pour conclure, nous pouvons dire que chez le PPV, la liaison entre les trimères fait intervenir des éléments structuraux caractéristiques qui n'ont jusqu'à aujourd'hui pas été décrits dans la littérature, notamment la présence des poches (à tryptophane et à proline) et de certains acides aminés décrits ci-dessus. Cependant, si ces éléments structuraux sont si importants pour l'assemblage des trimères et donc de la capsid, cela signifie qu'il devrait y avoir une conservation au cours de l'évolution chez les parvovirus.

II.2 Conservation du mode de liaison au cours de l'évolution

Dans le but de vérifier la possible conservation des poches au cours de l'évolution, nous nous sommes naturellement intéressé à l'étude et la visualisation du contact entre les trimères chez d'autres parvovirus dont les structures sont disponibles dans la base de données VIPER, et qui ont été très largement étudiés au cours des années.

Les virus étudiés sont le parvovirus canin CPV, le parvovirus félin FPV, qui appartiennent comme le PPV au genre Parvovirus, le B19 qui appartient au genre Erythrovirus et enfin le AAV qui appartient au genre Dependovirus (figure 2).

Ce que nous avons pu observer clairement, c'est que deux poches permettant d'accommoder le tryptophane et la proline sont conservées au cours de l'évolution (figure 15B), et ceci malgré des variations dans la liaison. (Voir partie discussion). De plus ces deux poches comportent à leur base des acides aminés qui sont conservés (proline 123 et glutamine 127 chez le PPV) dans la Sous-famille des Parvovirinae (Figure 15A).

En étudiant de manière plus approfondie une des structures du parvovirus canin (**Figure 15C**), nous avons pu observer la présence de molécules d'eau à l'intérieur de la poche à tryptophane, ces molécules pourraient intervenir dans le maintien et l'existence précoce (lors de la formation des trimères) de la poche (Figure 15C).

Enfin lors de l'étude de l'une des capsides du parvovirus félin nous avons pu observer que le tryptophane et la proline ne s'accommodaient pas dans leurs poches respectives, le PDB a pourtant été publié par un grand laboratoire et a déjà été utilisé comme référence dans plusieurs publications traitant de la structure des parvovirus. Nous avons donc découvert que le PDB qui se trouve dans les différentes bases de données (PDB, VIPER...) et qui a été publié était en fait incorrecte (Figure 15C).

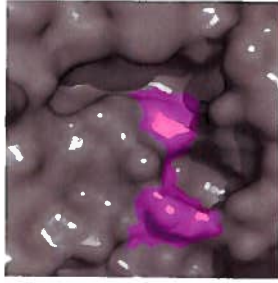
En conclusion nos résultats confirment notre hypothèse selon laquelle si les trimères sont l'intermédiaire d'assemblage et que cet assemblage se fait de manière (tardive) nucléaire alors la liaison entre les trimères devrait faire intervenir des éléments structuraux caractéristiques, et que ces éléments devraient être conservés au cours de l'évolution dans la sous-famille des Parvovirinae.

De plus la visualisation du contact entre les trimère n'a jamais été décrite dans la littérature, et en cela notre étude constitue une première qui pourrait servir de repère pour avoir une meilleur compréhension de l'effet de mutations effectuées dans cette zone mais surtout pour permettre de mieux comprendre le mécanisme d'assemblage entre les sous unités de la capside.

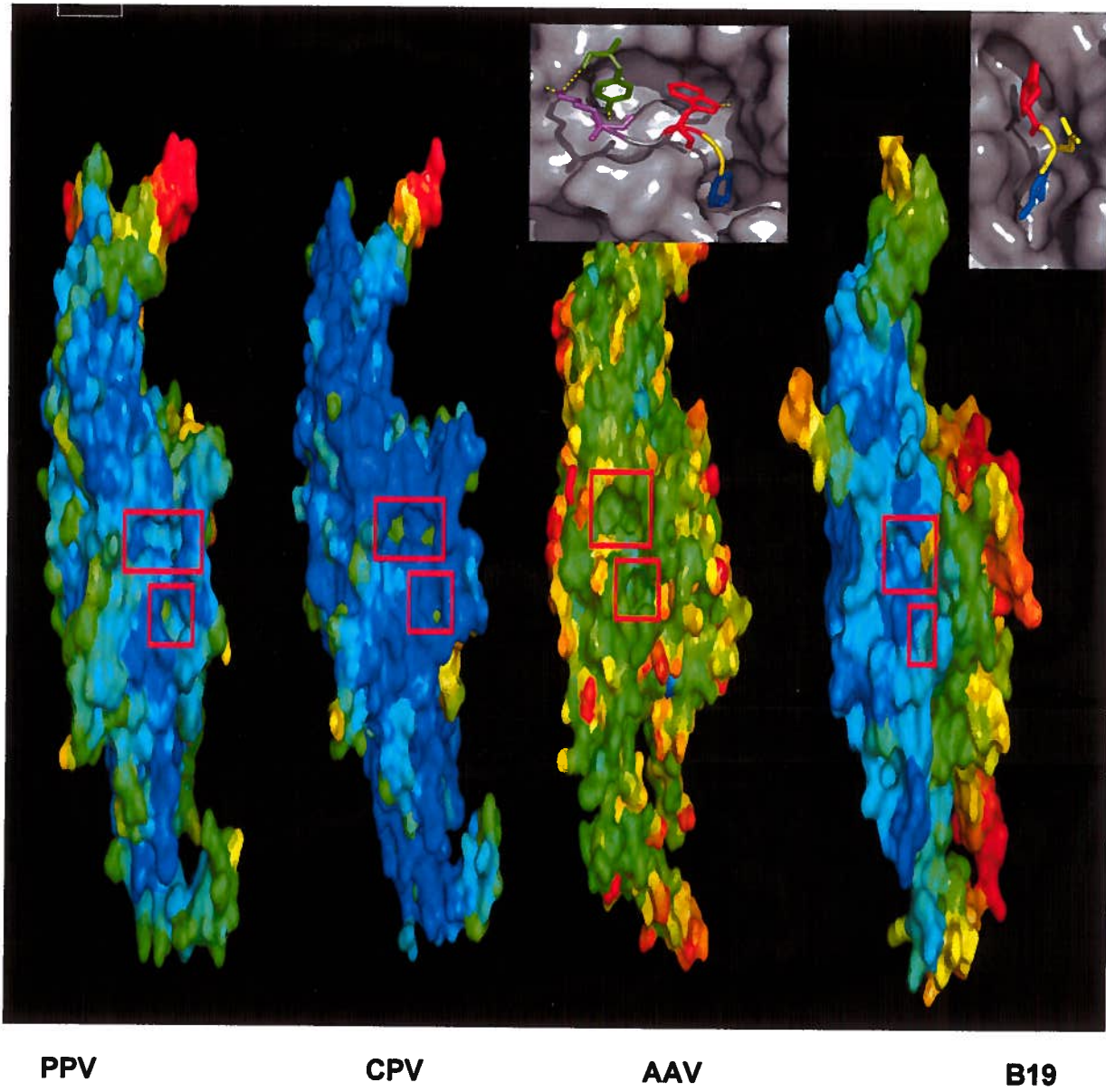
Figure 15 : Conservation du mécanisme de liaison au cours de l'évolution

- (A)** La proline 123 et la glutamine 127 formant les bases des poches sont en mauve
- (B)** Les deux poches sont encadrées en rouge chez différents membres de la famille Parvovirinae. Pour le AAV, la liaison aux poches fait intervenir une boucle contenant le tryptophane 557 (en rouge), la proline 559 (en bleu) et la lysine 555 (mauve) puis une tyrosine 260 (vert) provenant d'une autre chaîne.
Pour le B19, une boucle portant le tryptophane 503 (rouge) et la proline 505 (bleu) intervient dans la liaison.
- (C)** Chez le CPV, des molécules d'eau (boules bleues) ont été observées dans la poche qui bloque le tryptophane.
Chez le FPV, Le PDB correspondant à l'une des capsides est incorrecte.

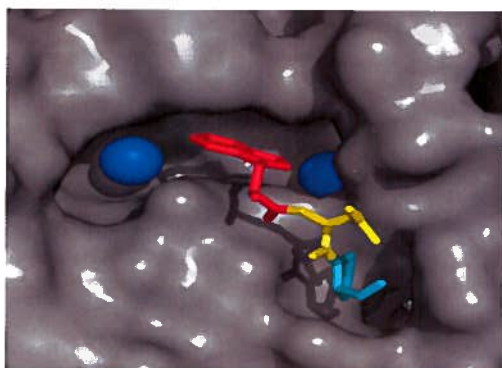
A



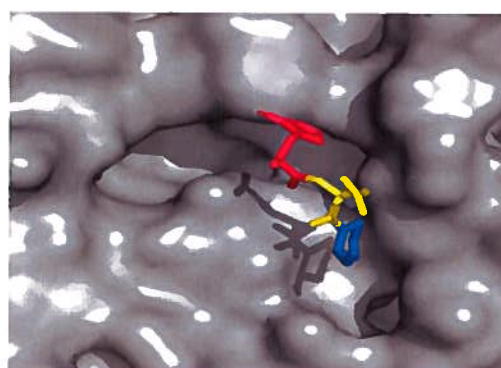
B



C



CPV : PDB=*2CAS*



FPV : PDB=*1C8F*

III. Expression et purification de VP2 mutée (W540-A), dans les cellules Sf9

La protéine VP2 à elle seule est capable de former la capside virale en cellules d'insectes (Sf9), de plus la mutation de l'acide aminé tryptophane 540 en alanine est connue pour empêcher la formation des capsides parvovirale, enfin le fait que ce tryptophane intervienne de manière très importante dans la liaison entre les trimères (cf I.), nous amène à penser que la production et la purification de la protéines VP2 (W540-A) en cellules d'insectes pourrait permettre l'obtention des intermédiaires trimériques en grande quantité, ce qui permettrait de prouver une fois pour toute que ces trimères existent et de pouvoir dans un second temps les étudier.

Pour exprimer la protéine VP2 mutée en cellules d'insectes Sf9, l'ADN muté codant pour la protéine a été cloné dans le vecteur pFastBac-HTB qui code pour un tag histidine en N-terminale. Puis, la nouvelle construction a été transformée dans les bactéries *E. coli* DH10Bac qui contiennent le bacmide (génome du baculovirus) ainsi qu'un plasmide auxiliaire permettant la recombinaison et donc la transposition du gène de VP2 (muté et contenant un Tag en N-terminal), dans le bacmide à l'intérieur d'un gène LacZ.

La sélection des bactéries a été réalisée sur des milieux contenant différents antibiotiques ainsi qu'IPTG et Xgal. Des bactéries blanches ont été sélectionnées, mises en culture et les bacmides recombinants extraits. La vérification de la présence du transgène a été réalisée par PCR, et ainsi plusieurs clones positifs ont pu être sélectionnés.

Les bacmides recombinants ont été utilisés pour la transfection de cellules de papillon Sf9, permettant ainsi la production puis l'amplification des stocks de baculovirus recombinants. La production de VP2 mutée a été vérifiée par immunobuvardage de type Western, sur les protéines issues des culots de cellules infectées.

Un flasque de 75 cm² à trois quart confluent, a été infecté avec le baculovirus recombinant (MOI de 1), et les cellules ont été recueillies 96 heures plus tard, puis lysées en conditions non dénaturantes pour les protéines. L'ensemble des protéines a été passé sur une matrice de billes NI-NTA pour permettre la purification de la protéine VP2 mutée et

munie d'un tag (6-Histidines en N-terminal). Les billes ont été lavées avec du tampon de lyse et du tampon de lavage puis ont été éluées avec un tampon d'éluion contenant 250mM d'imidazole. Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE et colorées au bleu de Coomassie pour vérifier la pureté de la protéine, ou transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées à l'aide d'un sérum de lapin anti-VP2, puis d'un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline (*figure 16*).

La présence de la protéine VP2 dans les surnageants issus de l'éluion, montre que la protéine a bien été produite. Cependant, la coloration au bleu de Coomassie montre que la protéine VP2 n'est pas la seule à se fixer à la matrice de billes NI-NTA, et que lors de l'éluion, beaucoup d'autres protéines sont co-éluées avec VP2. Pour remédier à ce problème, la concentration en imidazole du tampon de lavage a été augmentée (non montré), mais ceci n'a pas permis d'augmenter significativement le degré de pureté de la protéine.

En conclusion nous pouvons dire que la protéine VP2 a bien été produite en faible quantité en cellules d'insectes mais que le degré de pureté est faible malgré l'utilisation d'un tag 6-Histidines et donc nous pouvons difficilement pour l'instant vérifier le poids moléculaire du complexe formé (trimères en théorie) sur un gel natif par exemple ou encore produire des anticorps contre les complexe formés.

Une production en plus grande quantité pourrait cependant être testée.

Figure 16 : Production et purification du mutant W549-A protéines recombinantes en cellules Sf9

(A) Immunobuvardage de type Western sur les protéines de cellules Sf9 infectées avec du baculovirus recombinant et après purification sur billes NI-NTA et révélation avec un anticorps polyclonal anti-VP2.

(B) Migration des protéines sur gel SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie

(1) : Marqueur de poids moléculaire

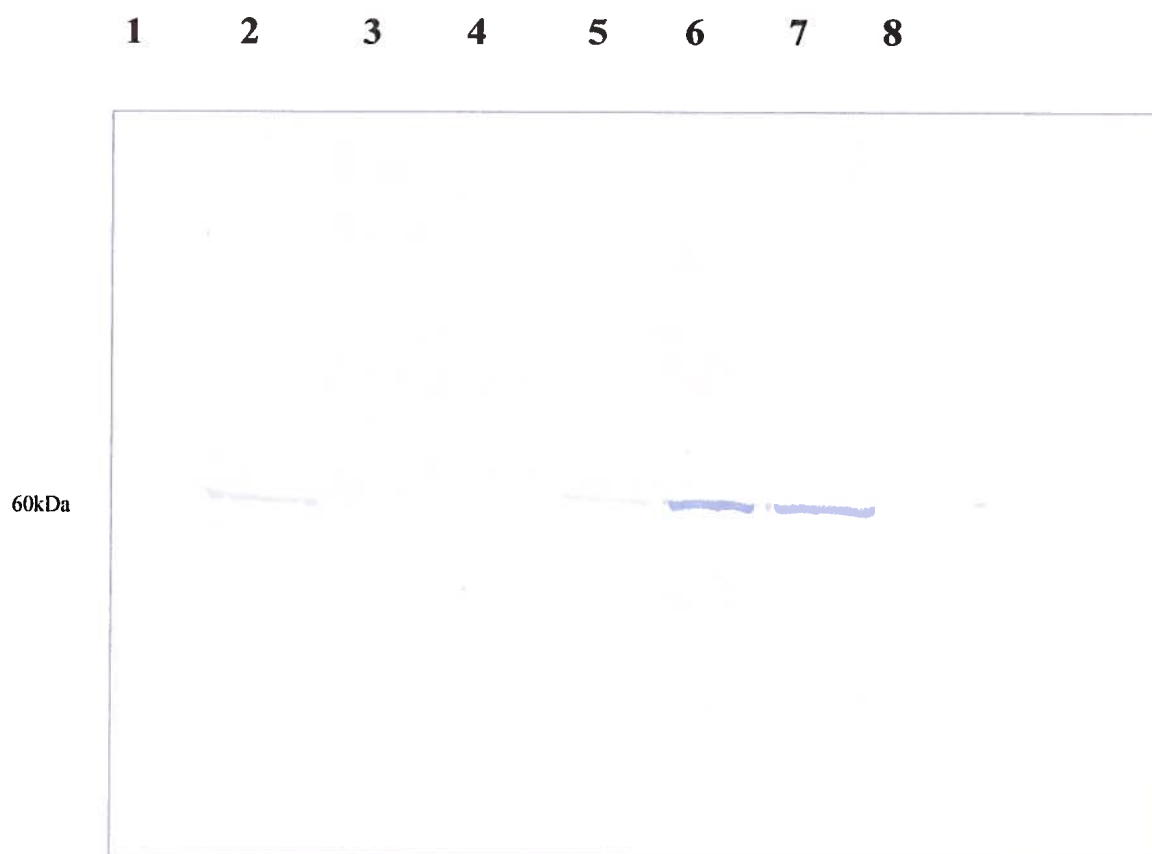
(2) : Surnageant de protéines (« flow-through ») après passage sur les billes

(3) : Surnageant de protéines après lavage avec le tampon de lyse

(4) : Surnageant de protéines après lavage avec le tampon de lavage

(5) (6) (7) (8) : Surnagent protéique après élution

A



B

1 2 3 4 5 6 7 8

60kDa



IV. Visualisation et analyse du contact intra-trimères

Les contacts qui existent entre les monomères pour former un trimère sont très nombreux et majoritairement hydrophobes, en visualisant le contact qui existe à l'intérieur des trimères nous espérons faire ressortir des éléments structuraux qui permettraient de casser les trimères en monomères, c'est-à-dire empêcher l'assemblage des monomères en trimères, assemblage qui d'après le modèle hypothétique devrait se faire de manière précoce dans le cytoplasme.

Deux monomères faisant partie d'un trimère ont été générés à l'aide du générateur d'oligomères de la VIPERdb, le fichier contenant les deux protéines a été modifié pour permettre le traitement sous PyMOL. Les acides aminés entrant en contact entre les deux protéines ont pu être sélectionnés en utilisant la table de contact de la VIPERdb, et la visualisation du contact a été permise par la séparation des monomères sous PyMOL (*Figure 17*).

L'observation en cartoon et en surface montre que la liaison entre les protéines pour former le trimère est difficile à décortiquer, notamment car elle fait intervenir un grand nombre de repliement et d'enchevêtrements des boucles 3 et 4 entre les protéines. Il est cependant possible de voir que la partie C-terminale de VP2 intervient de manière caractéristique dans la liaison puisque les derniers acides aminés (plus spécialement la tyrosine 579) sont complètement piégés dans la liaison entre les deux protéines.

Nous avons alors conclu que la mutation de la partie C-terminale pouvait potentiellement amener à la formation de monomères en empêchant la formation des trimères et qu'ainsi il pourrait être intéressant de raccourcir celle-ci en retirant la leucine qui se trouve juste avant la tyrosine 579 ou encore de l'allonger en ajoutant une tyrosine après la tyrosine 579, pour voir si dans un premier temps cela pouvait affecter la formation des trimères et dans une deuxième temps si cela pouvait permettre de former des monomères (*voir V.*)

Figure 17 : Visualisation du contact entre les sous-unités formant un trimère

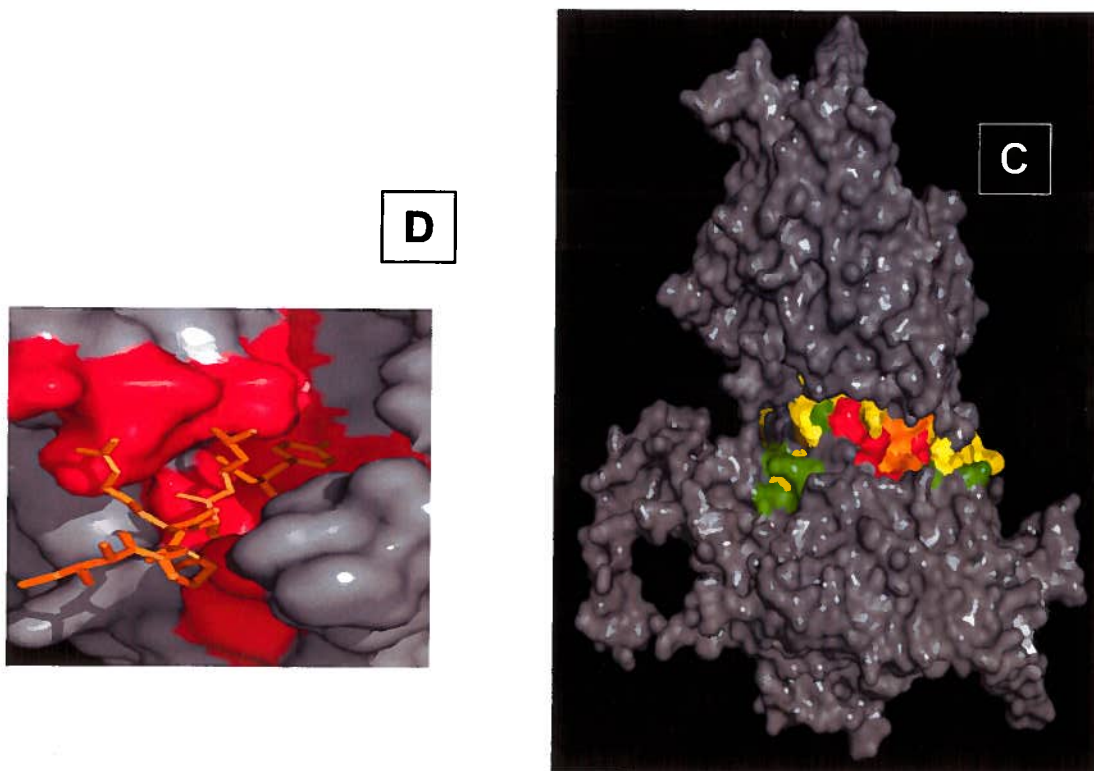
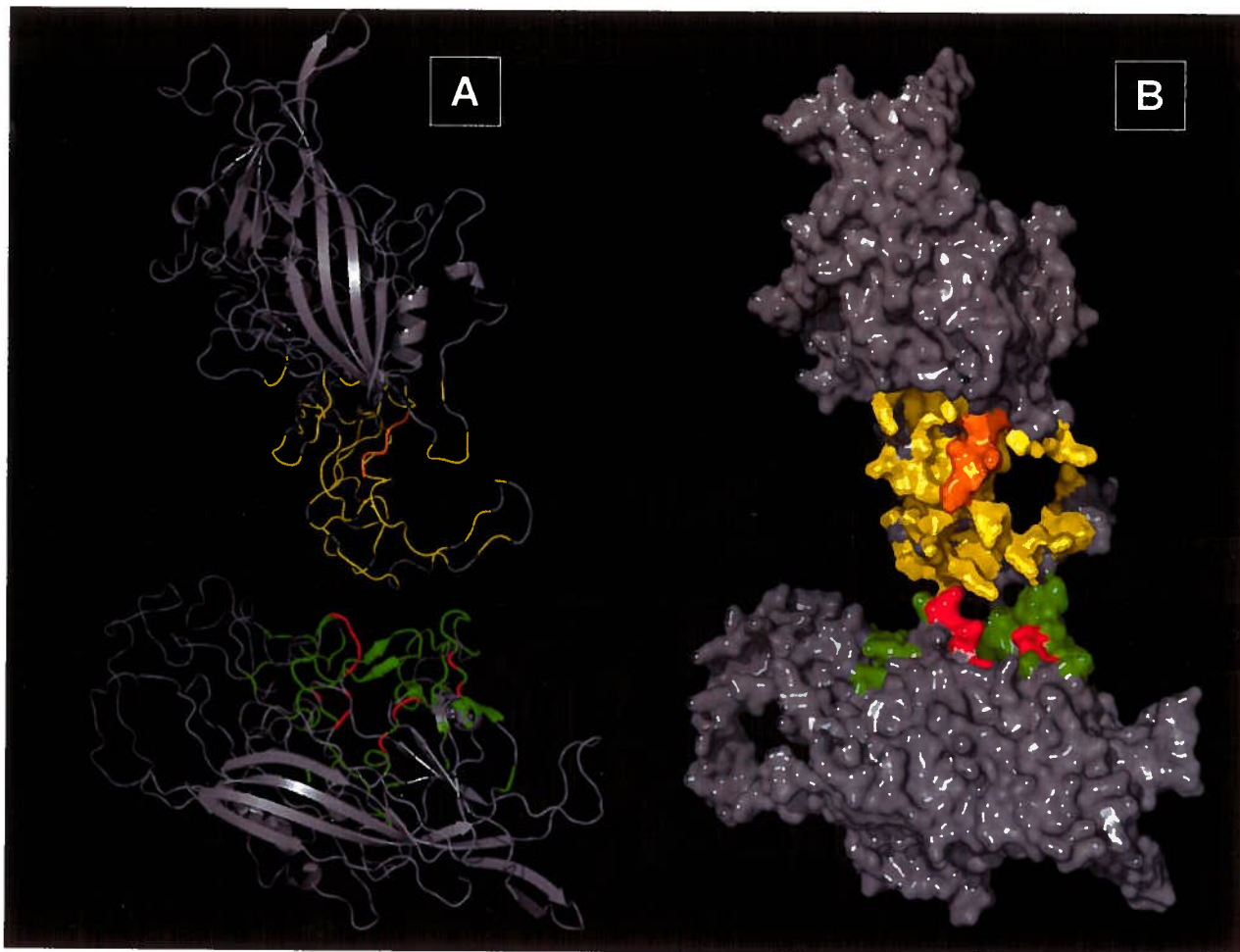
(A) Visualisation en cartoon de deux monomères vus de l'intérieur de la capsid et séparés de plusieurs dizaines d'Å. Les acides aminés en contact entre les molécules 1 et 7 (conventions de la VIPERdb) ont été sélectionnés puis colorés en jaune (molécule 1) et vert (molécule 7), les 5 acides aminés de la partie C-terminale de la protéine 1 (PRKLY) ont été colorés en orange et les acides aminés de la protéine 7 en contact avec ceux-ci en rouge.

(B) Vue en surface de la figure (A).

(C) Vue en surface des deux protéines non séparées.

(D) Vue en bâton de la partie C-terminale de VP2.

(E) Vue de la partie C-terminale dans le contexte d'un trimère vue interne.





V. Expression des mutants Leu(-) et Tyr(+) en C-terminale dans les cellules PT

V.1. Obtention des mutants

La production des mutants en C-terminal des VP (qui consiste à enlever la Leucine qui se trouve devant la Tyrosine 579 ou à rajouter une Tyrosine après la Tyrosine 579 de VP2) a été réalisée par PCR, en utilisant une amorce sens dont la séquence se trouve dans VP2 et une amorce anti-sens, comprenant la partie C-terminale des VP, la mutation voulue et un site de restriction SpeI. Le produit de PCR obtenu a été cloné dans un vecteur intermédiaire contenant la région répétée, la région unique et l'épingle à cheveux terminale du clone infectieux. Ce sous-clonage a permis grâce à une compatibilité entre les sites SpeI et XbaI de régénérer la partie du génome comprise entre la partie terminale des VP et la région unique (en plus de la mutation voulue). La nouvelle construction a été séquencée et la présence des mutations vérifiée.

Un échange de fragments entre le vecteur intermédiaire obtenu et le clone infectieux a permis d'obtenir un clone génomique contenant des VP mutées en C-terminale et là encore un séquençage a été effectué pour confirmer la présence des mutations ainsi que la non présence de mutations non désirées.

V.2. Transfection et révélation des mutants dans les cellules PT

Les clones génomiques contenant les mutations ont été utilisés pour la transfection de cellules PT. Le clone infectieux c'est-à-dire ne contenant aucune mutation, a servi de témoin positif de transfection, tandis que les cellules non transfectées, ont servi de témoin négatif.

La révélation du phénotype des mutants a été réalisée par immunofluorescence. Pour cela, les cellules ont été fixées et perméabilisées, 24 heures post-transfection. Puis, elles ont été mises en contact avec un mélange d'anticorps primaires. Le mélange a été constitué d'un sérum anti-VP2 de lapin, et d'un anticorps monoclonale anti-capside (3C9-D11-H11) de souris.

Un mélange d'anticorps secondaire a ensuite été ajouté, ce mélange contenait un anticorps anti-lapin (anti-IgG de lapin) couplé à un fluorophore Alexa 488 permettant

l'observation microscopique de la protéine VP2 en vert, et un anticorps anti-souris (anti-IgG de souris) couplé à un fluorophore Alexa 568 permettant l'observation microscopique de la capside en rouge.

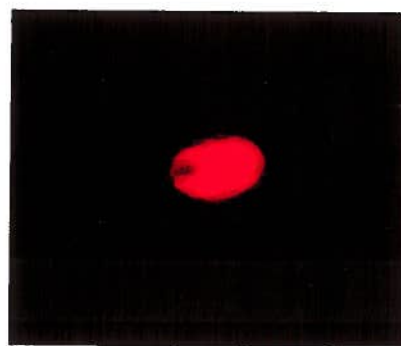
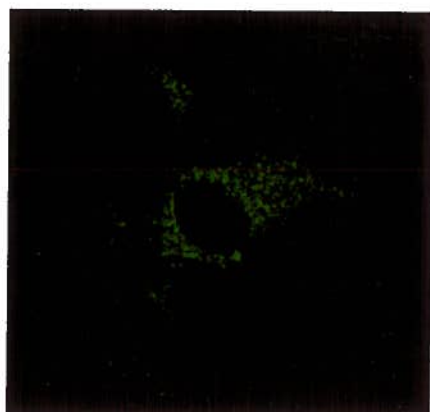
La présence de capside et de VP2 dans le noyau cellulaire a été vérifiée dans le cas d'une transfection avec le clone infectieux, et une localisation cytoplasmique de la VP2 a été observée pour les deux mutants Leu- et Tyr+ de la partie C-terminale (*Figure18*).

Pour conclure nous pouvons dire que la mutation de la partie C-terminale empêche bien la formation de la capside dans le noyau, la cumulation des protéines VP2 dans le cytoplasme indique que la partie C-terminale joue un rôle très important dans la formation des trimères puisque d'après le modèle d'assemblage seul les trimères bien formés devraient être transportés au noyau. Nous ne pouvons cependant pas encore dire si les trimères sont seulement mal formés ou si ils ne sont pas du tout assemblés, c'est-à-dire si nous avons des monomères dans le cytoplasme.

D'autre part il faut souligner le rôle de la partie C-terminale dans le sens ou d'après de récentes recherches (non encore publiées) et d'après le nombre et la nature des contacts intra-trimères, il est très difficile d'empêcher la formation de ces derniers alors que cela a pourtant été possible en mutant juste un acide aminé de la partie C-terminale de VP2.

Figure 18 : Phénotype des cellules PT transfectées avec les mutants Leu- et Tyr+

Les anticorps utilisés permettent la détection de VP2 en vert et de la capside en rouge. Aucune couleur rouge n'est apparue confirmant la non formation de capside, par contre la VP2 a été détectée dans le cytoplasme des cellules, et ceci pour les mutants Leu- et Tyr+.



Témoin : capsid nucléaire avec le clone infectieux

DISCUSSION

I. Points importants de la liaison entre les trimères

Différentes études ont suggéré que le trimère pourrait être un intermédiaire stable d'assemblage de la capside (Wu et Rossmann, 1993; Chapman et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996; Yuan et Parrish, 2001; Reguera et al., 2004, et Riolobos et al., 2006). L'étude par mutagenèse en alanine d'acides aminés situés à l'interface entre les trimères de la capside du MVM, et intervenant dans un grand nombre de liaisons, a montré que seuls certains résidus clefs étaient importants pour la liaison. Cependant, ces acides aminés ne sont pas tous conservés chez tous les parvovirinae (Reguera et al., 2004). Notre objectif était donc de mieux comprendre la liaison entre les trimères pour faire ressortir un possible mécanisme physique d'assemblage commun dans la sous-famille des Parvovirinae.

L'étude de la surface de contact entre les trimères a montré que le contact faisait intervenir une boucle projetant deux acides aminés conservés dans la sous-famille Parvovirinae (la proline 542 et le tryptophane 540) vers le trimère opposé. L'existence de poches permettant d'accommoder ces deux acides aminés a été observée dans notre étude. De plus, les deux poches comportent à leurs bases, deux acides aminés conservés dans la sous-famille: la proline 123, qui se trouve au sommet d'une hélice alpha, et la glutamine 127, qui se trouve aussi dans la même hélice (*Figure 15A*).

La présence des deux poches a été confirmée en observant les structures cristallographiques d'autres parvovirus. Cependant, la composition en acides aminés ainsi que la morphologie, varient significativement d'un genre à l'autre, et le mode de liaison des acides aminés conservés diffère aussi de manière importante. Ainsi, dans le cas des Dependovirus (AAV), on peut voir que la poche du tryptophane est composée de deux parties, une partie droite qui lie le tryptophane (557), notamment à l'aide d'une liaison hydrogène avec la tyrosine 583 de la chaîne opposée, et d'une partie gauche, liant la tyrosine 260 (notamment par liaison polaire avec l'acide aspartique 158). La boucle qui contient le tryptophane et la proline comporte aussi une lysine 555 qui est liée à l'acide aspartique 94 de la chaîne opposée, bloquant ainsi la tyrosine 260 dans la poche qui elle-même est liée au tryptophane 557 par son cycle benzène. (*Figure 15B*).

Dans le genre Erythrovirus, la tête du tryptophane est orientée de manière à s'accommoder dans une poche qui est en position presque verticale. (*Figure 15B*).

Chez le MVM la mutation du tryptophane 203 (Reguera et al., 2004), bien que non conservée dans la sous-famille Parvovirinae, et étant située au sommet de la poche (l'équivalent chez le PPV est le tryptophane 200), ne déstabilise pas les trimères mais par contre, empêche la liaison entre les trimères lors de l'étape d'assemblage nucléaire, confirmant le rôle important de la poche et son implication dans l'étape finale d'assemblage. Un résultat similaire a de même été obtenu lors de la mutation de la proline 123 qui constitue la base de cette poche (Mémoire de maîtrise Eliane Akl, non publié).

Chez le MVM et le CPV, différentes cavités contenues dans la structure de la capside ont été étudiées, certaines de ces cavités sont stabilisées et maintenues à l'aide de molécules d'eau (Carreira et Mateu, 2006). Nous avons donc étudié la « poche à tryptophane » chez le CPV et avons pu observer que cette poche comportait effectivement un certain nombre de molécules d'eau qui ont été piégées lors de l'assemblage, la présence de ces molécules permettrait de soutenir une hypothèse selon laquelle cette poche existerait durant des étapes précoces de l'assemblage, c'est-à-dire suite à la formation des trimères dans le cytoplasme cellulaire. (*Figure 15C*)

La structure cristallographique de différentes souches de CPV et de FPV a été déterminée à différents pH et avec ou sans la présence de calcium (Simpson et al, 2000). Nous avons analysé le contact entre les trimères de ces différentes structures et avons pu observer que l'une des structures du parvovirus félin qui avait été déposée lors de cette étude, semble contenir une erreur de modélisation. En effet, le tryptophane et la proline ne se trouvent pas dans les poches censées les contenir. Cette structure devrait donc être étudiée et corrigée au plus vite car différentes publications l'utilisent à des fins de comparaisons structurales avec d'autres parvovirus (Kaufmann et al, 2004) (*Figure 15C*)

Les structures caractéristiques qui interviennent dans la liaison entre les trimères ainsi que la conservation de certains acides aminés dans la sous-famille des Parvovirinae, amènent irrémédiablement à se poser la question suivante: mais qu'en est-il du mode de

liaison chez les Densovirinae ? Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés au densovirus de *Galleria mellonella*, qui appartient au Genre Densovirus (sous-famille Densovirinae), dont la structure cristallographique a été résolue (Simpson et al., 1998). Une boucle équivalente à celle portant le tryptophane et la proline a été trouvée chez ce virus. Cette boucle projette une phénylalanine (F398) qui est piégée dans la chaîne opposée. La mutation de cet acide aminé pourrait permettre la rupture de la liaison entre les trimères. (*Figure 19*)

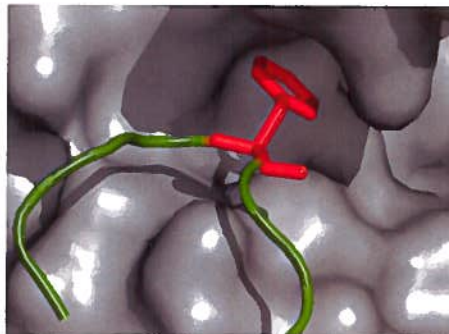
II. Production de VP2 mutée (W540A) en cellules d'insectes

La présence d'intermédiaire trimériques a été observée lors d'expériences de sédimentation sur gradient de sucrose d'extraits provenant de cellules de mammifères transfectées, avec des plasmides contenant des mutations dans les protéines de structure à l'interface entre les trimères (Riolobos et al., 2006).

La production et la purification à l'aide d'un tag Histidine du mutant W540-A en cellules d'insectes, constitue une solution de choix pour avoir une grande quantité de protéines qui permettrait l'étude du complexe produit par la mutation, ou encore pour produire des anticorps contre ce complexe. Les résultats obtenus dans notre étude sont prometteurs dans le sens où la production à petite échelle et la purification de la protéine (ou du complexe) ont été possibles et laissent présager qu'une production et une purification à plus grande échelle est possible. De plus, si le complexe trimérique attendu était produit par cette mutation, il serait possible d'utiliser une sédimentation sur gradient de sucrose, pour voir approximativement la taille du complexe formé, et ainsi prouver de manière définitive l'existence de l'intermédiaire trimérique d'assemblage. En ce qui concerne la production d'anticorps contre le complexe produit, il serait important de faire une production à plus grande échelle mais surtout d'utiliser des méthodes complémentaires (à celle du Tag Histidine) de purification de la protéine. En effet, le degré de pureté de la protéine après purification sur colonne est faible.

Figure 19 : Conservation du mécanisme de liaison au cours de l'évolution

Le GmDNV qui appartient à la sous-famille des Densovirinae, comporte une boucle (vert) qui projette un acide aminé qui n'est pas un tryptophane, mais une phénylalanine (rouge) qui est bloquée de manière caractéristique par la chaîne opposée.



GMDNV : PDB= *1DNV*

III. Mutations dans la partie C-terminale de VP2

La présence d'un grand nombre d'interactions entre les trois protéines formant un trimère et le fait que ces interactions soient majoritairement hydrophobes (Wu et Rossmann, 1993; Chapman et Rossmann, 1993; Xie et Chapman, 1996) nous amènent à penser que « casser » par mutation les trimères, c'est-à-dire empêcher leur formation, est une opération complexe d'autant plus que la mutation de nombreux acides aminés, à l'interface entre les trimères, n'avait pas permis d'empêcher la formation de la capsid (Reguera et al., 2004), alors que la liaison entre ces derniers est moins importante que celle qui existe entre les molécules pour former le trimère.

L'analyse que nous avons faite de l'interaction entre les protéines pour former un trimère, a montré que cette liaison était très complexe. Néanmoins, il apparaît que la partie C-terminale joue un rôle important dans cette liaison, et plus spécifiquement le dernier acide aminé, qui est la tyrosine 579 dans le cas du PPV.

Le fait de raccourcir ou d'allonger la partie C-terminale en retirant la leucine qui se trouve avant la tyrosine 579, ou en rajoutant une tyrosine après la tyrosine 579, conduit dans les deux cas à l'accumulation de VP2 dans le cytoplasme des cellules. Or, selon le modèle émis par Lombardo et al. (Lombardo et al., 2000 et 2002), chez le MVM, l'assemblage des monomères en trimères conduit à la formation d'un motif de localisation nucléaire, nécessaire au transport des trimères au noyau, donc l'accumulation cytoplasmique de VP2 pourrait être expliquée soit par le fait que les monomères ne s'assemblent pas en trimères, soit que les monomères s'assemblent en trimères mal formés, ce qui conduirait à la non exposition d'un motif de localisation nucléaire à leur surface.

Dans tous les cas, le phénotype observé confirme l'importance de la partie C-terminale dans la formation d'un trimère correctement replié. En effet, malgré le nombre important de liaisons entre les protéines pour former un trimère, les mutations effectuées ont déstabilisé la formation du trimère. D'autre part, le phénotype observé permet de confirmer l'hypothèse de Lombardo et al. selon laquelle la formation de trimères est un préalable au transport nucléaire.

Il faut noter que chez le PPV l'intervention du signal de localisation nucléaire de VP1 pour le transport des intermédiaires d'assemblage, n'a jamais été démontrée, cela pourrait constituer un sujet de recherche intéressant.

Pour savoir si les mutations effectuées ont engendré des monomères et non un trimère mal formé, il serait opportun de produire ces mutants ou un mutant possédant un tag Histidine en C-terminale, dans les cellules d'insectes à l'aide du système baculovirus, puis d'estimer la taille de la protéine (ou complexe) obtenue par sédimentation sur gradient de sucrose.

CONCLUSION

D'après la théorie de Lombardo et al. (Lombardo et al., 2000) les trimères sont l'intermédiaire d'assemblage de la capside. Ils sont produits dans le cytoplasme, migrent dans le noyau et s'assemblent en capside. Cela signifie que la liaison entre les trimères est une étape tardive de l'assemblage, et donc que cette liaison pourrait faire intervenir des éléments structuraux caractéristiques conservés au cours de l'évolution.

Dans cette étude nous avons découvert à l'interface entre les trimères, l'existence de poches comportant des acides aminés conservés et notamment une poche permettant d'accommoder un tryptophane qui lui-même est conservé. Cette poche, bien que présentant une morphologie, une taille et une constitution en acides aminés différentes, est restée présente au cours de l'évolution confirmant que la liaison entre les trimères fait intervenir des éléments structuraux conservés, et par la même occasion, confirmant le modèle d'assemblage émis par Lombardo et al.

L'importance de la liaison tryptophane-poche dans la liaison entre les trimères est confirmée par la littérature. En effet, par exemple, la liaison de la thaline à l'intégrine, permettant l'activation de cette dernière, fait intervenir la chaîne latérale du tryptophane W739 qui se fixe dans une poche située à la surface de la thaline (Calderwood, 2004), et ce type de liaison d'un tryptophane à une poche hydrophobe n'est pas un cas isolé et rend spécifiques les interactions protéine-protéine (St-Jean et al., 2007).

Il existe peu d'acides aminés conservés au cours de l'évolution chez les Parvovirinae, ceci nous amène à penser que certains d'entre eux pourraient tout comme le tryptophane être impliqués dans un mécanisme de liaison inter ou intra moléculaire. Une étude approfondie du contexte dans lequel se trouvent ces acides aminés est donc indispensable.

L'étude de la partie C-terminal ayant permis de montrer que cette dernière était impliquée de manière importante dans la formation des trimères, dans la production de la protéine VP2 mutée en C-terminale dans les cellules d'insectes ainsi que dans sa purification permettrait de compléter notre analyse.

Cette étude a aussi permis de montrer que la structure du parvovirus félin : 1C8F est incorrecte et qu'il serait important de la corriger.

Enfin, les méthodes informatiques utilisées dans notre étude, pourraient être appliquées à celle de la famille des Densoviridae ou d'autres virus à symétrie icosaédrique, contenus dans la base de données VIPER.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

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

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

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

Antonis, A. F., C. J. Bruschke, P. Rueda, L. Maranga, J. I. Casal, C. Vela, L. A. Hilgers, P. B. Belt, K. Weerdmeester, M. J. Carrondo, and J. P. Langeveld. 2006. A novel recombinant virus-like particle vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Vaccine* 24:5481-90.

Arella, M., S. Garzon, J. Bergeron, and P. Tijssen. 1990. Physicochemical properties, production and purification of parvoviruses, p. 11–30. *In* P. Tijssen (ed.), *Handbook of parvoviruses*, vol. I. CRC Press, Boca Raton, Fla.

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

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

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

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

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

Berns, K.I., Bergoin, M., Bloom, M., Lederman, M., Muzyczka, N., Siegl, G., Tal, J., Tattersall, P., 1994. Parvoviridae . Fifth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses. *In*: Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Arch. Virol. Suppl. 10, pp. 166_ 178.

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

Bolt, D. M., H. Hani, E. Muller, and A. S. Waldvogel. 1997. Non-suppurative myocarditis in piglets associated with porcine parvovirus infection. *J Comp Pathol* 117:107-18.

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

Calderwood, D. A. 2004. Integrin activation. *J Cell Sci* 117:657-66

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

Carreira, A., and M. G. Mateu. 2006. Structural tolerance versus functional intolerance to mutation of hydrophobic core residues surrounding cavities in a parvovirus capsid. *J Mol Biol* 360:1081-93.

Carrillo-Tripp, M., C. M. Shepherd, I. A. Borelli, S. Venkataraman, G. Lander, P. Natarajan, J. E. Johnson, C. L. Brooks, 3rd, and V. S. Reddy. 2009. VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res* 37:D436-42.

Cater, J. E., and D. J. Pintel. 1992. The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol* 73 (Pt 7):1839-43.

Chang, S. F., J. Y. Sgro, and 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. *J Virol* 66:6858-67.

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

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

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

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

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

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

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

Cotmore SF, Tattersall P: DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Semin Virol* 1995, 6:271-281

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

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

Daya, S., and K. I. Berns. 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21:583-93.

Drolet, R., S. D'Allaire, R. Larochelle, R. Magar, M. Ribotta, and R. Higgins. 2002. Infectious agents identified in pigs with multifocal interstitial nephritis at slaughter. *Vet Rec* 150:139-43.

Dundas, J., Z. Ouyang, J. Tseng, A. Binkowski, Y. Turpaz, and J. Liang. 2006. CASTp: computed atlas of surface topography of proteins with structural and topographical mapping of functionally annotated residues. *Nucleic Acids Res* 34:W116-8.

Durham, P. J., A. Lax, and R. H. Johnson. 1985. Pathological and virological studies of experimental parvoviral enteritis in calves. *Res Vet Sci* 38:209-19.

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

Eterpi, M., G. McDonnell, and V. Thomas. 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect* 73:64-70.

Farkas, S. L., Z. Zadori, M. Benko, S. Essbauer, B. Harrach, and P. Tijssen. 2004. A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the genus Dependovirus. *J Gen Virol* 85:555-61.

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

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

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

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

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

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

Harding, M. J., and T. W. Molitor. 1992. A monoclonal antibody which recognizes cell surface antigen and inhibits porcine parvovirus replication. *Arch Virol* 123:323-33.

Heldt, C. L., R. Hernandez, U. Mudiganti, P. V. Gurgel, D. T. Brown, and R. G. Carbonell. 2006. A colorimetric assay for viral agents that produce cytopathic effects. *J Virol Methods* 135:56-65.

Hogg, G. G., C. Lenghaus, and A. J. Forman. 1977. Experimental porcine parvovirus infection of foetal pigs resulting in abortion, histological lesions and antibody formation. *J Comp Pathol* 87:539-49.

Hueffer, K., and C. R. Parrish. 2003. Parvovirus host range, cell tropism and evolution. *Curr Opin Microbiol* 6:392-8.

Jenkins, C. E. 1992. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine parvovirus in fetal tissues. *J Virol Methods* 39:179-84.

Jindal, H. K., C. B. Yong, G. M. Wilson, P. Tam, and C. R. Astell. 1994. Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions. *J Biol Chem* 269:3283-9.

Joo, H. S., C. R. Donaldson-Wood, and R. H. Johnson. 1976. Observations on the pathogenesis of porcine parvovirus infection. *Arch Virol* 51:123-9.

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

Kaufmann, B., P. R. Chipman, V. A. Kostyuchenko, S. Modrow, and M. G. Rossmann. 2008. Visualization of the externalized VP2 N termini of infectious human parvovirus B19. *J Virol* 82:7306-12.

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

Kim, J., and C. Chae. 2004. A comparison of virus isolation, polymerase chain reaction, immunohistochemistry, and in situ hybridization for the detection of porcine circovirus 2 and porcine parvovirus in experimentally and naturally coinfecting pigs. *J Vet Diagn Invest* 16:45-50.

Kim, J., D. U. Han, C. Choi, and C. Chae. 2003. Simultaneous detection and differentiation between porcine circovirus and porcine parvovirus in boar semen by multiplex seminested polymerase chain reaction. *J Vet Med Sci* 65:741-4.

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

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

Ladekjaer-Mikkelsen, A. S., and J. Nielsen. 2002. A longitudinal study of cell-mediated immunity in pigs infected with porcine parvovirus. *Viral Immunol* 15:373-84.

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

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

Lau, S. K., C. C. Yip, T. L. Que, R. A. Lee, R. K. Au-Yeung, B. Zhou, L. Y. So, Y. L. Lau, K. H. Chan, P. C. Woo, and K. Y. Yuen. 2007. Clinical and molecular epidemiology of human bocavirus in respiratory and fecal samples from children in Hong Kong. *J Infect Dis* 196:986-93.

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

Lindner, J., and S. Modrow. 2008. Human bocavirus--a novel parvovirus to infect humans. *Intervirology* 51:116-22.

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

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

Lopez-Bueno, A., M. P. Rubio, N. Bryant, R. McKenna, M. Agbandje-McKenna, and J. M. Almendral. 2006. Host-selected amino acid changes at the sialic acid binding pocket of the parvovirus capsid modulate cell binding affinity and determine virulence. *J Virol* 80:1563-73.

Madsen, E. S., K. G. Madsen, J. Nielsen, M. H. Jensen, J. C. Lei, and P. Have. 1997. Detection of antibodies against porcine parvovirus nonstructural protein NS1 may distinguish between vaccinated and infected pigs. *Vet Microbiol* 54:1-16.

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

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

Mayr, A., P. A. Bachmann, G. Siegl, H. Mahnel, and B. E. Sheffy. 1968. Characterization of a small porcine DNA virus. *Arch Gesamte Virusforsch* 25:38-51.

McKillen, J., B. Hjertner, A. Millar, F. McNeilly, S. Belak, B. Adair, and G. Allan. 2007. Molecular beacon real-time PCR detection of swine viruses. *J Virol Methods* 140:155-65.

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

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

Mengeling, W.L., 2006. Porcine parvovirus. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*, 9th edition. Blackwell Publishing, Ames, IA.

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

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

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

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

Miao, L. F., C. F. Zhang, C. M. Chen, and S. J. Cui. 2009. Real-time PCR to detect and analyze virulent PPV loads in artificially challenged sows and their fetuses. *Vet Microbiol* 138:145-9.

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

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

Molitor, T. W., H. S. Joo, and M. S. Collett. 1985. KBSH parvovirus: comparison with porcine parvovirus. *J Virol* 55:257-63.

Molitor, T. W., K. Oraveerakul, Q. Q. Zhang, C. S. Choi, and L. R. Ludemann. 1991. Polymerase chain reaction (PCR) amplification for the detection of porcine parvovirus. *J Virol Methods* 32:201-11.

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

Naeger, L. K., J. Cater, and 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. *J Virol* 64:6166-75.

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

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

Nawagitgul, P., P. A. Harms, I. Morozov, B. J. Thacker, S. D. Sorden, C. Lekcharoensuk, and P. S. Paul. 2002. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:33-40.

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

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

Opriessnig, T., M. Fenaux, S. Yu, R. B. Evans, D. Cavanaugh, J. M. Gallup, F. J. Pallares, E. L. Thacker, K. M. Lager, X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2004. Effect of porcine parvovirus vaccination on the development of PMWS in segregated early weaned pigs coinfecting with type 2 porcine circovirus and porcine parvovirus. *Vet Microbiol* 98:209-20.

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

Padron, E., V. Bowman, N. Kaludov, L. Govindasamy, H. Levy, P. Nick, R. McKenna, N. Muzyczka, J. A. Chiorini, T. S. Baker, and M. Agbandje-McKenna. 2005. Structure of adeno-associated virus type 4. *J Virol* 79:5047-58.

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

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

Paul, P. S., W. L. Mengeling, and T. T. Brown, Jr. 1980. Effect of vaccinal and passive immunity on experimental infection of pigs with porcine parvovirus. *Am J Vet Res* 41:1368-71.

Pintel, D. J., A. Gersappe, D. Haut, and J. Pearson. 1995. Determinants that govern alternative splicing of parvovirus pre-mRNAs. *Semin. Virol.* 6:283-290.

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

Qi, T., and S. Cui. 2009. Expression of porcine parvovirus VP2 gene requires codon optimized *E. coli* cells. *Virus Genes*.

Reddy, V. S., P. Natarajan, B. Okerberg, K. Li, K. V. Damodaran, R. T. Morton, C. L. Brooks, 3rd, and J. E. Johnson. 2001. Virus Particle Explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses. *J Virol* 75:11943-7.

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

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

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

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

Rymerson RT, Babiuk L, Menassa R, Vanderbeld B, Brandle JE 2003 Immunogenicity of the capsid protein VP2 from porcine parvovirus expressed in low alkaloid transgenic tobacco. *Mol Breeding* 11:267-276.

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

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

Shaughnessy, E., D. Lu, S. Chatterjee, and K. K. Wong. 1996. Parvoviral vectors for the gene therapy of cancer. *Semin Oncol* 23:159-71.

Shepherd, C. M., I. A. Borelli, G. Lander, P. Natarajan, V. Siddavanahalli, C. Bajaj, J. E. Johnson, C. L. Brooks, 3rd, and V. S. Reddy. 2006. VIPERdb: a relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res* 34:D386-9.

Simister, P., M. Schmitt, M. Geitmann, O. Wicht, U. H. Danielson, R. Klein, S. Bressanelli, and V. Lohmann. 2009. Structural and functional analysis of hepatitis C virus strain JFH1 polymerase. *J Virol* 83:11926-39

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

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

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

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

St-Jean, M., T. Izard, and J. Sygusch. 2007. A hydrophobic pocket in the active site of glycolytic aldolase mediates interactions with Wiskott-Aldrich syndrome protein. *J Biol Chem* 282:14309-15

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

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

Tattersall, P., Bergoin, M., Bloom, M. E., Brown, K. E., Linden, R. M., Muzyczka, N., Parrish, C. R., & Tijssen, P. Parvoviridae. In "Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV" (C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, & L. A. Ball, Eds.). Elsevier/Academic Press, London, 2005

Tijssen, P. 1999. Molecular and structural basis of the evolution of parvovirus tropism. *Acta Vet Hung* 47:379-94.

Tijssen, P., Bergeron, J., Dubuc, R. & Hébert, B. (1995). Minor genetic changes among porcine parvovirus groups are responsible for major distinguishing biological properties. *Semin Virol* 6, 319–328.

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

Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J. & other authors (2000). *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses*. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, CA: Academic Press.

Vihinen-Ranta, M., S. Suikkanen, and C. R. Parrish. 2004. Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. *J Virol* 78:6709-14.

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

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

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

Xie, Q., W. Bu, S. Bhatia, J. Hare, T. Somasundaram, A. Azzi, and M. S. Chapman. 2002. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10405-10.

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

Yigang, X. U., and L. I. Yijing. 2008. Construction of recombinant *Lactobacillus casei* efficiently surface displayed and secreted porcine parvovirus VP2 protein and comparison of the immune responses induced by oral immunization. *Immunology* 124:68-75.

Young, P. J., K. T. Jensen, L. R. Burger, D. J. Pintel, and C. L. Lorson. 2002. Minute virus of mice small nonstructural protein NS2 interacts and colocalizes with the Smn protein. *J Virol* 76:6364-9.

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

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

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

Zeeuw, E. J., N. Leinecker, V. Herwig, H. J. Selbitz, and U. Truyen. 2007. Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *J Gen Virol* 88:420-7.

Zimmermann, P., M. Ritzmann, H. J. Selbitz, K. Heinritzi, and U. Truyen. 2006. VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *J Gen Virol* 87:295-301.